

**DAS VERHALTEN VON SCHILDDRÜSENHORMONEN
UND CORTICOSTERON IM MODELL DES
PERFUNDIERTEN HINTERBEINES DER RATTEN:
VERSUCHE UNTER KONTROLLIERTEN
STOFFWECHSELBEDINGUNGEN BEI RUHE BZW.
BEI KURZFRISTIGER SUBMAXIMALER ARBEIT***

Roland Gärtner

1977

AUS DER MEDIZINISCHEN KLINIK INNENSTADT
DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

DIREKTOR: PROFESSOR Dr. E. BUCHBORN

DAS VERHALTEN VON SCHILDDRÜSENHORMONEN UND CORTICOSTERON
IM MODELL DES PERFUNDIERTEN HINTERBEINES DER RATTE:
VERSUCHE UNTER KONTROLLIERTEN STOFFWECHSELBEDINGUNGEN BEI
RUHE BZW. BEI KURZFRISTIGER SUBMAXIMALER ARBEIT⁺.

INAUGURAL - DISSERTATION
ZUR ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE IN DER GESAMTEN MEDIZIN
AN DER LUDWIG MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT ZU MÜNCHEN



vorgelegt von

Roland Gärtner
aus Friedberg

1976

⁺ Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. P.C. Scriba

Mitberichterstatter: Prof. Dr. E. Buchborn

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 8.3.1977



MEINEN ELTERN

Herrn Prof.Dr.med.P.C.SCRIBA danke
ich für die freundliche Überlassung
des Themas und seine unermüdliche Hilfe.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn
Dr.med.Ch. Dieterle, der diese Arbeit
tatkräftig unterstützte.

Besonders herzlich möchte ich Frau M.Zauner
danken, die einen großen Teil der Stoffwechsel-
parameterbestimmungen mit viel Geschicklich-
keit und Ausdauer durchführte.

Ganz besonders herzlich möchte ich Herrn
J.Henner für die tatkräftige Unterstützung
in technischen Problemen des Versuchsaufbaues
danken.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
<u>1.</u> <u>EINLEITUNG</u>	1
<u>2.</u> <u>METHODEN</u>	
und Vorversuche zum Modell des perfundierten Hinterbeins	2
2.1. Präparation der Ratte	5
2.1.1. Aufbau der Perfusionskammer	6
2.1.2. Druckmessung, Vorversuche	7
2.1.3. Muskelreizung	9
2.1.4. Arbeitsmaschine, Vorversuche	10
2.2. Perfusionsmedium, Zusammensetzung und Aufbereitung	12
2.2.1. Standardperfusionsmedium	12
2.2.2. Korrektur des Standardperfusions- mediums	13
2.2.2.1. Waschvorgang der Erythrocyten	13
2.2.2.2. Extraktion der nicht veresterten Fettsäuren (NFS) aus Rinderalbumin	14
2.2.2.3. Endgültige Zusammensetzung des Standardperfusionsmediums	14
2.2.3. Pufferkontrolle	15
2.2.4. Ansatz der Stammlösungen für die einzelnen Hormone	15
2.2.4.1. Insulin-Stammlösung	15
2.2.4.2. Corticosteron-Stammlösung	16
2.2.4.3. L-Thyroxin (T_4)-Stammlösung	16
2.2.4.4. Trijodthyronin (T_3)-Stammlösung	16
2.2.4.5. $^{125}\text{J}-T_4/T_3$ -Stammlösung	17
2.2.4.6. $1\beta-2\beta-^3\text{H}$ -Corticosteron-Stammlösung	17
2.3. Durchführung der Perfusion	17
2.3.1. Auswertung der Perfusionsprotokolle	20
2.4. Berechnung des Substratumsatzes	32
2.4.1. Statistik	33

3.	<u>DER MUSKELSTOFFWECHSEL</u> in Ruhe und während Arbeit zur Überprüfung der Validität des Modells	34
3.1.	Bestimmungsmethoden	34
3.1.1.	Bestimmung von Glucose, Lactat, Pyruvat und Glycogen	34
3.1.2.	Bestimmung der freien Fettsäuren und Glycerin	35
3.1.3.	Kohlenhydratstoffwechsel	35
3.1.4.	Fettstoffwechsel	43
4.	<u>UNTERSUCHUNGEN</u> zur Aufnahmekinetik von Schilddrüsen- hormonen und Corticosteron	56
4.1.	Bestimmungsmethoden	56
4.1.1.	Fluorimetrische Bestimmung von Corticosteron	56
4.1.2.	Qualitative radiologische Messung von 18-28- ³ H-Corticosteron	56
4.1.3.	Bestimmung von L-Thyroxin	57
4.1.4.	Qualitative radiologische Messung von ¹²⁵ J-T ₄ /T ₃	57
4.2.	Homogenisation und Differential- zentrifugation von Muskeln	57
4.2.1.	Vorbemerkung	57
4.2.2.	Muskelextraktion	58
4.2.3.	Homogenisation	58
4.2.4.	Gewebsauflösung und Flüssigkeits- szintillationszählung	58
4.3.	Ergebnisse der Untersuchungen mit Corticosteron	60
4.3.1.	Ergebnisse der fluorimetrischen Messungen	60
4.3.2.	Ergebnisse mit 18-28- ³ H-Corticosteron	62
4.3.3.	Ergebnisse der Zellfraktionierung	68
4.4.	Schilddrüsenhormone	70
4.4.1.	Vorbemerkung	70
4.4.2.	Ergebnisse mit "kaltem" T ₄	70
4.4.3.	Ergebnisse mit markiertem T ₄	71
4.4.4.	Ergebnisse mit markiertem T ₃	77
4.4.5.	Ergebnisse der Muskelzellfraktionierung	77

	Seite
<u>5.</u> DISKUSSION	82
5.1. Allgemeine Gesichtspunkte	82
5.2. Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsel	84
5.3. Aufnahmekinetik der Schilddrüsen- hormone und des Corticosterons	88
<u>6.</u> ZUSAMMENFASSUNG	93
SUMMARY	95
<u>7.</u> LITERATURVERZEICHNIS	97

1. EINLEITUNG

Vom Körpergewicht des Menschen entfallen etwa 40% auf die Muskelmasse. Diesem großen Organ Muskulatur kommt somit entscheidender Anteil an allen Stoffwechselprozessen zu. Hauptenergieträger für den ruhenden wie für den arbeitenden Muskel sind die Glucose und die nicht veresterten Fettsäuren (NFS), die in Form von Glycogen und Fett, im wesentlichen Triglyceride, intramuskulär gespeichert werden können, und die mit dem Einsetzen muskulärer Kontraktion sofort verfügbar sind. Bei länger dauernder Arbeit sind diese intramuskulären Energiespeicher rasch erschöpft und die Substratbereitstellung aus extramuskulären Energiespeichern - Leber und Fettgewebe - tritt in den Vordergrund.

Die Mechanismen der Substrateinschleusung in die Muskulatur sind weitgehend ungeklärt. So ist die Anwesenheit von Insulin für den Glucoseeinstrom in das periphere Gewebe absolut erforderlich; unter körperlicher Belastung, bei erheblich gesteigertem Glucoseumsatz, sinkt die pankreatische Insulinsekretion signifikant ab; offensichtlich unterliegt also die vermehrte Substrateinschleusung nicht nur zentralen, sondern vor allem unter Arbeitsbelastung auch lokalen Steuerungsmechanismen. Am besten belegt wird dies durch die klinische Erfahrung, daß es unter ausgewogener körperlicher Belastung beim Diabetiker zu einer Stabilisierung der Glucose-Homöostase, eventuell sogar zu einer Reduktion des Bedarfs an exogenem Insulin kommt.

Jede körperliche Arbeit führt zu einer Mehrsekretion einer Reihe kontrainsulinär wirkender Hormone. So kommt es zu einer Steigerung der Katecholaminsekretion, der Wachstumshormonsekretion, der Cortisolsekretion und des Thyroxinumsatzes. Ob diese Hormone nur eine Stimulation der Gluconeogenese und Glycogenolyse in der Leber bzw. eine Stimulation der Lipolyse im Fettgewebe induzieren, oder ob sie auch eine direkte Beeinflussung der Substrateinschleusung und des Substratumsatzes intramuskulär bewirken, ist nicht eindeutig geklärt. Die Substratbereitstellung aus den Energiedepots und die Substrateinschleusung in die ruhende und

arbeitende Muskulatur ist somit ein komplexes Geschehen, das von vielen Faktoren beeinflusst wird:

1. Die Energiespeicher, die abhängig sind vom Ernährungszustand, Trainingszustand, Hormonhaushalt, Krankheiten;
2. intaktes Kreislaufsystem und adäquater Gasaustausch;
3. das ZNS als Koordinationssystem.

Da dieses komplexe Geschehen (Abb. 1) am intakten Gesamtorganismus nur schwer zu durchschauen ist, wurden in der vorliegenden Arbeit die Untersuchungen am Modell des perfundierten Hinterbeins der Ratte durchgeführt.

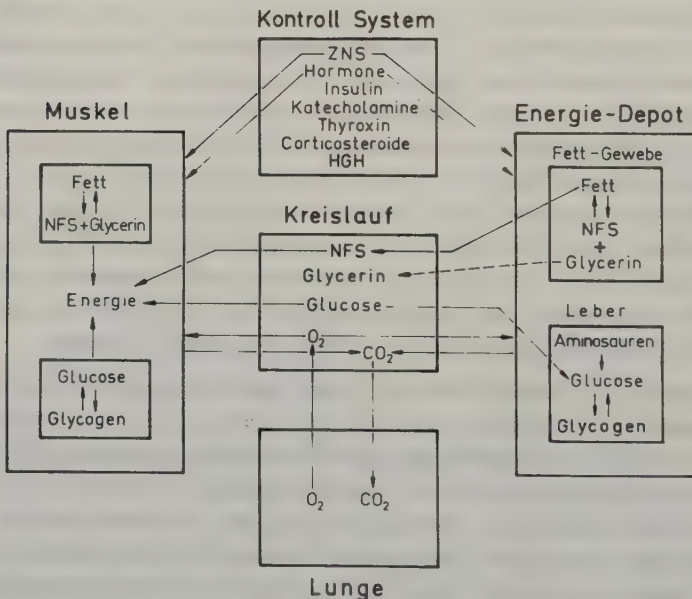


Abb.1 Einfaches Stoffwechsel schema

Kreislauf und Lunge wurden durch künstliche Systeme ersetzt, die Verbindung zum ZNS durchtrennt. Als Energiespeicher dient mit konstanter Substratzufuhr das Perfusat. In diesem Modell bleibt die Muskulatur Untersuchungsorgan, die frei wählbaren Variablen sind die Hormone.

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung des Muskelstoffwechsels bei Ruhe und bei Arbeit, mit und ohne Insulin, unter Zusatz von Corticosteron, Thyroxin und Trijodthyronin sowie das Verhalten dieser Hormone im peripheren Gewebe. Alle Untersuchungen wurden am gesunden Tier durchgeführt; die Ergebnisse sollen als Basis dienen für später durchzuführende Studien am kranken Tier.

2.

METHODEN

Über den Muskelstoffwechsel in vivo sowie am Modell des perfundierten Hinterbeines der Ratte liegen mehrere vergleichende Untersuchungen vor (9, 61, 86, 94, 103). Um die perfundierte Muskulatur unter physiologischen Bedingungen untersuchen zu können, wurden von N.C.RUDERMAN et al. (94) Kriterien erarbeitet, die unseren Untersuchungen zugrunde gelegt sind:

- Die Perfusionsdauer sollte auf eine Stunde beschränkt werden;
- die "flow-rate" sollte nicht unter 6 ml/min liegen;
- die Lactatproduktion der perfundierten Muskulatur (30 g) sollte nicht über 4 μ mol/min betragen;
- bei makroskopischer Betrachtung sollten keine Oedeme sichtbar werden;
- der Hämoglobingehalt des Perfusionsmediums sollte nicht unter 8 g% liegen.

Sind diese Bedingungen erfüllt, findet sich nach den Untersuchungen von RUDERMAN et al. (94) weder ein Abfall der intrazellulären energiereichen Phosphate - ATP und CP - noch lassen sich lichtmikroskopisch oder elektronenoptisch Veränderungen der Zelle oder der Zellorganellen nachweisen. Auf die Einhaltung dieser Kriterien wurde daher bei unseren Untersuchungen sorgfältigst geachtet; auf die zusätzliche Messung der intrazellulären energiereichen Phosphate bzw. auf lichtmikroskopische und elektronenoptische Untersuchungen haben wir verzichtet. Präparationstechnik und Perfusionsmaschine wurden weitgehend übernommen; um einen stets gleichen arteriellen "inflow" (pH-Wert, Substrat- und Hormonkonzentration) zu haben, perfundierten wir im offenen System; eine Rezirkulation fand also nicht statt.

2.1.

Präparation der Ratte

Die Untersuchungen wurden an 180-240 g schweren, männlichen Wistar-Ratten (Stamm BR-46-Wistar II, Brünger, Bokel, BRD) durchgeführt. Bis zum Zeitpunkt der Untersuchung hatten die Tiere Zugang zu Altromin und Wasser ad libidum.

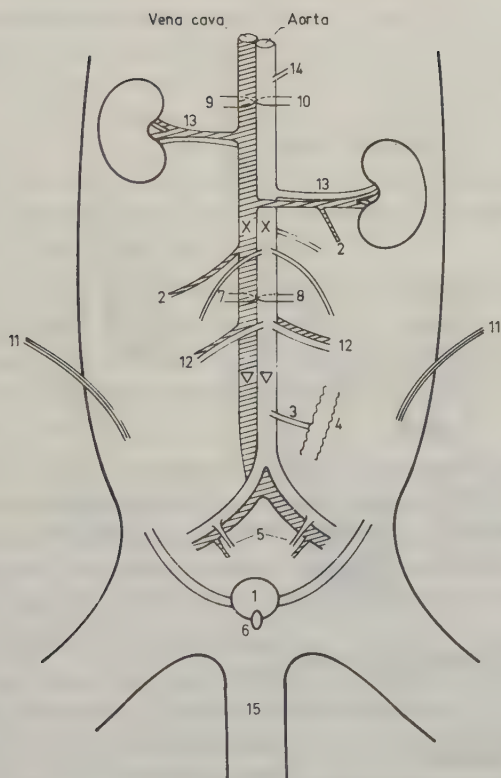
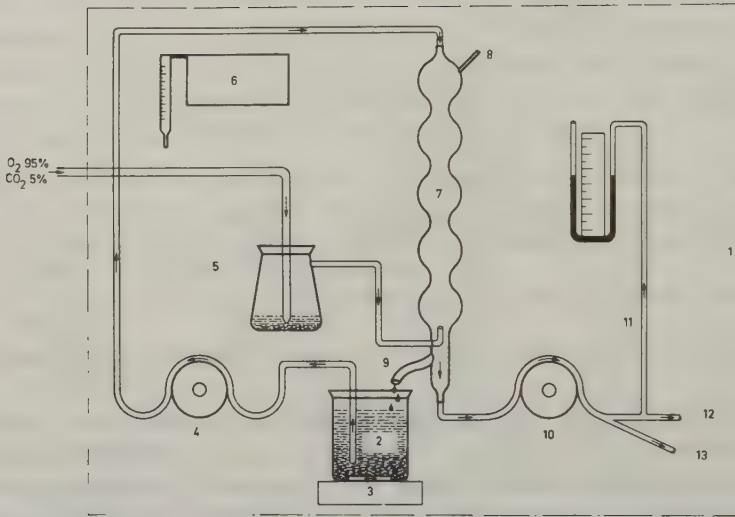


Abb. 2 Schematische Darstellung des Situs

Abb. 2: Schematische Darstellung des Situs (nach RUDERMAN (94)).
Bei der Präparation wurden die Gefäße 2, 3, 5, 11, 12
und 13 unterbunden.

- | | |
|-------------------------------------|------------------------|
| 1 - Harnblase | 9/10 - Ligaturen um |
| 2 - Art. und vena testicularis | die vena cava |
| 3 - Art. mesenterica inf. | und aorta abd. |
| 4 - Colon descendens | 11 - Epigastrica inf. |
| 5 - Art. und vena iliaca int. | (a. und v.) |
| 6 - Prostata | 12 - Iliolumbargefäß |
| 7 - Ligaturen, die um die bei | 13 - Nierengefäß |
| 8 - X eingeführten Katheter geführt | 14 - Truncus coeliacus |
| wurden | 15 - Schwanz |



Versuchsanordnung zur Muskelperfusion am Hinterbein

Abb. 3: Perfusionskammer.

- 1 - geschlossene Perfusionskammer
- 2 - Perfusionsgemisch
- 3 - Magnetrührer
- 4 - Pumpe 1
- 5 - Waschflasche
- 6 - Thermostat mit Thermometer
- 7 - Glaslung
- 8 - Überdruckventil
- 9 - Überlaufventil
- 10 - Pumpe 2
- 11 - Manometer zur Druckmessung
- 12 - Arterieller Einlauf zum Versuchstier
- 13 - Arterieller Auslaß zur Probenahme.

Die Pfeile geben die Flußrichtung von Carbogen bzw. vom Perfusionsgemisch an.

Die Narkose erfolgte mit Äther und Pentobarbital-Na (Nembutal^R) 80 mg/kg intraperitoneal. Anstelle eines Skalpells benützten wir für die Präparation einen Thermokauter, um Substratverlust durch Puffer- bzw. Lymphaustritt an den Schnittflächen zu verhindern. Die Präparation führten wir auf einem metallenen Operationstisch durch, der über ein Thermostat auf 37^O C konstant gehalten wurde. Mittels verstellbarer Metallklammern konnten die Extremitäten und der Schwanz der Tiere in jeder gewünschten Stellung fixiert werden.

Nach Unterbindung sämtlicher großer Seitengefäße, der Aorta abdominalis und Vena cava inf. (Abb. 2) wurden die Tiere im kleinen und großen Becken total evisceriert und Polyäthylenkatheter in die Aorta abdominalis und in die Vena cava inf. eingeführt (94).

Die paraaortalen Lymphknoten und die Lymphgefäße wurden aufgesucht und hitzekoaguliert, um einen Substratverlust über den Lymphweg aus den unteren Extremitäten zu vermeiden (94). Ebenso wurden die sympathischen Ganglien entfernt, um Gefäßkonstriktionen des perfundierten Gewebes zu verhindern (92, 94).

Zur Implantation der Reizelektrode (siehe 2.1.3.) entfernten wir das Fell über der Wirbelsäule von Th 10 bis L 2 und führten die selbstgefertigte bipolare Reizelektrode (2.1.3.) zwischen Th 12 und L 1 in das Rückenmark ein. Eventuell auftretende Blutungen wurden hitzekoaguliert.

Das so präparierte Tier wurde in Rückenlage auf dem Operationstisch fixiert und ein Gegengewicht (100 g) zur arbeitenden Muskulatur über ein Rollensystem an den unteren Extremitäten angebracht (2.1.4.). Das Gegengewicht wurde mit Hilfe eines s-förmig gebogenen Stahldrahtes an den Patellarsehnen und an den Krallen eines jeden Beines befestigt.

2.1.2. Druckmessung, Vorversuche

Da druckabhängige Autoregulationsvorgänge perfundierter Gefäße bekannt sind (55), mußte der Perfusionsdruck konstant gehalten werden. Zur exakten, jederzeit ablesbaren Messung des Perfu-

sionsdruckes fertigten wir uns ein L-Rohr mit 1 mm Innendurchmesser aus V₂A-Stahl an, das in ein Glasröhrchen eingeschmolzen wurde. Der Druck wurde direkt als Blutsäule über dem L-Rohr abgelesen (Abb. 4).

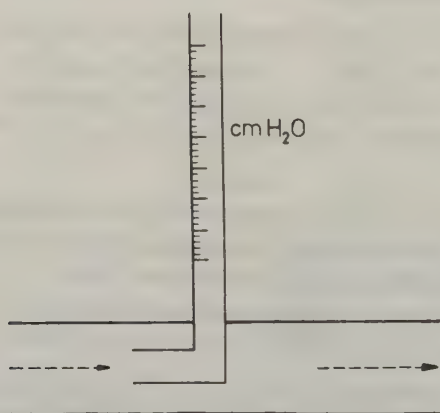


Abb. 4 Druckmessung

Auf diese Weise erfassen wir die gesamte Energie:

$$E_{\text{ges.}} = E_{\text{kin.}} + E_{\text{hydrostat.}}$$

Die kinetische Energie wird an dem 90°-Winkel des L-Rohres in hydrostatische Energie umgewandelt und addiert sich zum hydrostatischen Druck.

Um die Richtigkeit unseres Druckmeßsystems experimentell zu belegen, präparierten wir bei vier Ratten die Aorta frei, schoben retrograd unmittelbar nach Abgang der Nierengefäße einen Katheter in die Aorta, einen zweiten Katheter schoben wir orthograd bis zur Aufzweigung der Aorta in die beiden Ae.iliacae. Die freien Katheterenden wurden mit dem von uns angefertigten

Druckmeßröhrchen verbunden. Der Druck, der sich nach ca. fünf Minuten einstellte und bis zum Abbruch des Versuches nach 30 Minuten gehalten wurde, lag zwischen 90 und 110 cm Blutsäule H_2O . Die Werte liegen in dem in der Literatur angegebenen Bereich (35).

2.1.3. Muskelreizung

Vorversuche hatten gezeigt, daß zur direkten Reizung der Muskulatur hohe Spannungen bis zu 50 V erforderlich sind, um befriedigende Kontraktionen zu erreichen. Auch bei diesen hohen Spannungen wurden nie alle Muskeln gleichzeitig gereizt. Da die Stimulation über die zugehörigen motorischen Nerven physiologischen Bedingungen entspricht und nur auf diese Weise alle Muskeln gereizt werden können, versuchten wir den N.ischiadicus und den N.femoralis freizulegen. Diese Präparationstechnik stellte sich aber als zu langwierig heraus. Wir entschlossen uns daher, das präparativ einfach zugängliche Rückenmark im Bereich des Plexus ischiadicus zu stimulieren. Zu diesem Zwecke fertigten wir selbst eine bipolare Reizelektrode an (Abb. 5).

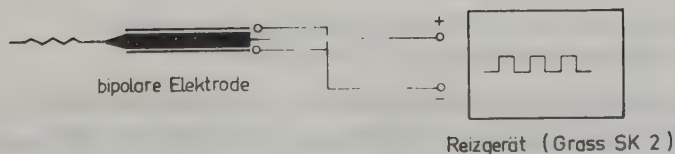


Abb. 5 Muskelreizung

Die Elektrode führten wir, wie unter 2.1. beschrieben, in das Rückenmark ein und schlossen sie an das Reizgerät an. Das Gerät ist dem Grass SK 2-Stimulator nachgebaut. Es lieferte uns Rechteckreize in variabler Frequenz und Spannung. Jeder Rechteckreiz ist aus 20 Einzelimpulsen (je 200 μ sec) zusammengesetzt. Entsprechend den Angaben von BÜHRING et al. (16) dauerte jeder Rechteckreiz 0,1 sec.

Mit dieser Art von Rechteckreizen konnten alle Muskeln, Agonisten wie auch Antagonisten, der unteren Extremität zur Kontraktion gebracht werden. Der Nachweis der tatsächlichen Aktivität der Muskeln wurde mit einem Kathodenstrahloszillographen mit Vorverstärker geführt. Wir leiteten das Summenmembranpotential aller oberflächlich liegenden Muskeln ab.

Die vom Reizgerät ausgehende Spannung wurde zwischen 1 und 5 Volt eingestellt, wobei die tatsächliche Spannung an der einzelnen Nervenfaser jedoch sicher niedriger lag, da Verbindungskabel, Elektrode und Gewebe einen relativ hohen Widerstand darstellten.

Die Impulsfrequenz legten wir auf 1 Imp/3 sec bei einer Impulsdauer von 0,1 sec fest, da sich erwiesen hatte, daß bei dieser Impulsfrequenz eine gute Leistung der Muskulatur über 10 Minuten aufrecht erhalten werden konnte (siehe auch 2.1.4.).

2.1.4. Arbeitsmaschine, Vorversuche

Die Versuchsanordnung zur Standardisierung der Muskelarbeit wurde unter folgenden Gesichtspunkten erarbeitet:

1.) Nach jeder Kontraktion sollten die einzelnen Muskeln wieder in die gleiche Ausgangsstellung (L_0) mit gleicher Vorspannung gebracht werden, denn die Spannungsentwicklung (und somit letztlich die Arbeit) der einzelnen Muskelfaser hängt außer von der Art der Reizung (Einzelreiz, tetanische Reizung) von seiner Länge (L_0) ab (39).

2.) Die einzelnen Muskeln führen eine auxotone Kontraktion durch (39), da sich die Gegenkraft bei jeder Verkürzung durch Änderung der Gelenkstellung und damit Änderung des Hebelarmes ebenfalls ändert.

Allen Muskelfasern sollten, um Arbeit leisten zu können:

$$A = p \times s$$

A = Arbeit

p = Kraft

s = Weg

neben einer konstanten Verkürzung eine möglichst konstante Kraft entgegengesetzt werden.

Wir wählten deshalb folgende Versuchsanordnung (Abb. 6):

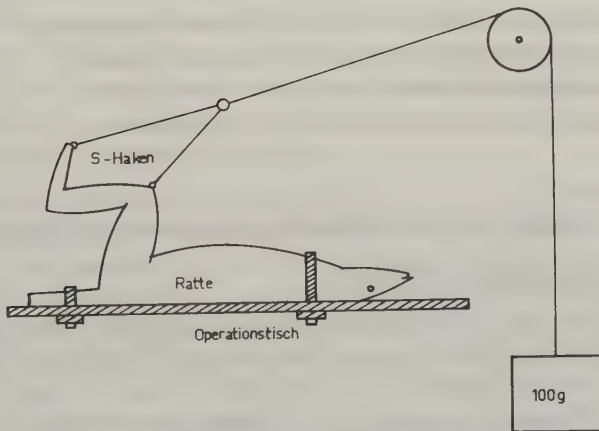


Abb. 6 Arbeitsvorrichtung

Den Streckmuskeln der großen Gelenke (m.quadrizeps, m.gastrocnemius, m.soleus, m.gluteus max.), die den Beugern an Kraft weit überlegen sind (empirisch nachgewiesen), sollte eine konstante Kraft entgegengesetzt werden. Den Beugemuskeln, die durch die Art unserer Reizung gleichzeitig mit den Streckern zur Kontraktion gebracht wurden, dienten als Gegenkraft die Streckmuskeln.

Wie unter 2.1. beschrieben, wurden an den Patellarsehnen und an den Krallen s-förmige Haken befestigt, die unter einem Drahring zusammengefaßt wurden (Abb. 6). Bei jeder Kontraktion wurde das verwendete Gewicht die gleiche Wegstrecke gehoben; in der Erschlaffungsphase wurde die Muskulatur auf die Ausgangslage L_0 zurückgebracht.

In Vorversuchen mit 200 g, 150 g und 100 g hatten wir ermittelt, daß 100 g Gewicht an der oberen Grenze des Leistungsvermögens lagen.

Die Hubhöhe pro Kontraktion nahm nach 3 - 5 Minuten langsam ab. Da dies bei allen Versuchen der Fall war und die Versuchsbedingungen konstant gehalten wurden, wurde auf eine genaue, zahlenmäßige Erfassung der geleisteten Arbeit verzichtet.

2.2. Perfusionsmedium, Zusammensetzung und Aufbereitung

2.2.1. Standardperfusionsmedium

Als Grundlage unseres Perfusionsmediums diente ein Krebs-Ringerleit-Bicarbonat-Puffer (KRB-Puffer) nach WEINGES (110). Diesem Puffer wurden 4 g% Rinderalbumin krist. (Fa.Behring-Werke) zugesetzt. Als Sauerstoffträger verwendeten wir gewaschene Humanerythrozyten in Ringerlösung, die wir von der Blutbank bezogen. Wir verwendeten folgende Zusammensetzung (80):

- 150 ml KRB-Puffer
- 250 ml gewaschene Humanerythrozyten
- 250 ml Ringerlösung
- 26 g Rinderalbumin krist. (Fa.Behring-Werke)
- 1,3 g Glucose.

Genaue Analysen des Puffers ergaben folgende Werte (alle Parameter wurden mit den üblichen Geräten zur routinemäßigen Blutuntersuchung gemessen; alle Werte wurden doppelt gemessen und der Mittelwert errechnet).

Na ⁺	145 mval/l	Ery	2,84 Mill.	P _{O2}	275,7 mm Hg
K ⁺	3,66 mval/l	Leuko	412	P _{CO2}	51,4 mm Hg
Ca ⁺⁺	2,3 mval/l	Hb	8,7 g%	HCO ₃	12,7 mval/l
Cl ⁻	125 mval/l	Hkrit	27%	CO ₂ total	14,6 mmol/l
				base	
				excess	19,0 mval/l

2.2.2. Korrektur des Standard-Perfusionsmediums

Da sich die K⁺- und die Ca⁺⁺-Konzentrationen, bedingt durch die Verdünnung mit Ringerlösung zu niedrig gegenüber der Norm erwiesen, verwendeten wir daraufhin gewaschene, konzentrierte Humanerythrozyten (250 ml), und statt 150 ml KRB-Puffer 400 ml KRB-Puffer. Das zu niedrige Standard-Bicarbonat und den hohen base excess versuchten wir auszugleichen mit einer einstündigen Begasung des eiskühlten KRB-Puffers mit CO₂.

Da die Lactatkonzentrationen der von der Blutbank bezogenen, gewaschenen Humanerythrozyten im Mittel 28 mg% (zwischen 20 mg% und 35 mg%) betrugen, was auf die lange Lagerungszeit zurückzuführen ist, entschlossen wir uns, die Erythrozyten selbst zu waschen und das Blut von frisch geschlachteten Schweinen jeweils am gleichen Tag eines Versuches vom Schlachthof zu beziehen.

2.2.2.1. Waschvorgang der Erythrozyten

500 ml frisches Schweineblut wurden mit 125 ml "Stabilisator" vermischt.

Zusammensetzung des Stabilisators (alle Substanzen Fa. Merck) :

Trinatrium citricum x 2 H ₂ O	13,2 g
Acidum citricum	4,8 g
Saccharum amylaceum	14,7 g
Adenin	0,34 g
Aqua dest.	1000 ml

Das Blut-Stabilisator-Gemisch wurde in 100 ml Zentrifugengläsern bei 2000 Upm 10 Minuten lang in einer Hetzel Silenta II Laborzentrifuge zentrifugiert. Der trübe Überstand wurde abgesaugt. Mit

physiologischer Kochsalzlösung wurden die Zentrifugengläser wieder auf 100 ml aufgefüllt und abermals zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder abgesaugt und der Vorgang so lange wiederholt, bis der Überstand klar war. Dies war in der Regel nach fünf Waschvorgängen erreicht. Nach dem letzten Absaugen wurde nicht mehr mit physiologischer Kochsalzlösung aufgefüllt, sondern die gewaschenen Erythrozyten sofort dem vorher bereiteten KRB-Albumin-Puffer zugesetzt.

2.2.2.2. NFS-Extraktion aus Rinderalbumin

Das Albuminmolekül ist in der Lage, langkettige Fettsäuren an drei unterschiedlich starken Bindungsstellen zu binden (18). Die NFS-Konzentration des von uns verwendeten chromatographisch reinen Rinderalbumins schwankten in einer 4%igen Lösung zwischen 1200 und 1800 mval/l.

Um die hohen NFS-Konzentrationen in unserem Perfusionsmedium zu senken, entfernten wir einen Großteil der NFS aus den Bindungsstellen des Albumins durch folgenden Waschvorgang:

- Äthanol absol. + Diäthyläther im Verhältnis 1:3 mischen,
- in 100 ml dieses Gemisches maximal 10 g Albumin bei 4° C ca. 2 Stunden lang auf einem Magnetrührer rühren lassen,
- mit Papierfilter das Albumin abfiltrieren,
- im Vakuum (Exsiccator) das Albumin trocknen, bis es wieder fein kristallin ist.

Durch diesen Waschvorgang erreichten wir NFS-Konzentrationen in unserem Puffer (2.2.3.) zwischen 400 und 900 mval/l.

2.2.2.3. Endgültige Zusammensetzung des Standardperfusionsmediums

Die endgültige Pufferzusammensetzung lautete folgendermaßen:

400 ml KRB-Puffer
250 ml Schweine-Erythrozyten, gewaschen
26 g Rinderalbumin, fettfrei gewaschen
1,3 g Glucose
0,1 mM Pyruvat-Na⁺

(Pyruvat wurde zugesetzt, um im arteriellen Perfusionsmedium einen physiologischen Lactat-Pyruvat-Quotienten von 5-10 zu bekommen (94)).

2.2.3. Pufferkontrolle

Den vollständig angesetzten Puffer ließen wir 30 Minuten lang in der Perfusionskammer unter Versuchsbedingungen, jedoch ohne ein Tier angeschlossen zu haben, rezirkulieren. Anschließend bestimmten wir den Sauerstoff- und Kohlendioxyd-Partialdruck, sowie die Substrat- und Elektrolyt-Konzentrationen im Serum anhand der üblichen Routinemethoden. Folgende Werte wurden in vier verschiedenen Versuchen ermittelt.

Pufferzusammensetzung, nach 30 Minuten Rezirkulation in der Perfusionskammer:

pO_2	pCO_2	pH	Na^+	K^+	Ca^{++}
mm Hg	mm Hg		mval	mval	mval
$308 \pm 40,79$	$30,0 \pm 2,6$	$7,39 \pm 0,02$	$144 \pm 1,4$	$4,05 \pm 0,10$	$4,5 \pm 0,1$

Glucose: $195,1 \pm 0,2$ mg% = $10,84 \pm 0,01$ mMol/l

Lactat : $15,2 \pm 1,7$ mg% = $1,67 \pm 0,19$ mMol/l

Pyruvat: $24,8 \pm 0,1$ mg% = $2,76 \pm 0,01$ mMol/l

NFS : 605 ± 24 mval/l

Glycerin: $33,5 \pm 0,1$ μ Mol/l

2.2.4. Ansatz der Stammlösungen für die einzelnen Hormone

Wir setzten Stammlösungen der verwendeten Hormone an, von denen dann jeweils die Menge dem Perfusionsmedium zugesetzt wurde, um die gewünschte Hormonkonzentration zu erzielen.

2.2.4.1. Insulin-Stammlösung

Wir verwendeten beef insulin krist. (Firma Novo)

1 mg beef insulin enthält 25,8 IE

4 mg beef insulin wurden in 100 ml 0,1 n HCl gelöst

1 ml davon auf 20 ml 4% Albumin-KRB-Puffer;

1 ml dieser Stammlösung enthält dann 0,05 IE Insulin.

750 μ l dieser Stammlösung in 650 ml Perfusionsmedium ergibt rechnerisch die gewünschten 150 μ E/ml Insulin. Radioimmunologisch ließ sich dieser Wert bestätigen.

2.2.4.2. Corticosteron-Stammlösung

Wir verwendeten Corticosteron purum der Firma Fluka.

50 mg Corticosteron wurden in 5 ml Äthanol abs. gelöst und mit Aqua dest. auf 1000 ml aufgefüllt.

1 ml der Stammlösung enthält dann 50 μ g Corticosteron.

5,2 ml dieser Stammlösung in 650 ml Perfusionsmedium ergibt rechnerisch eine Corticosteron-Konzentration von 40 μ g%. Da jedoch ein Teil des Hormons an der Glaswand der Gefäße haften bleibt, mußten wir 10 ml der Stammlösung zusetzen, um fluorimetrisch gemessen eine Konzentration von $38,25 \pm 1,86$ μ g% ($n=10$) zu erzielen.

2.2.4.3. L-Thyroxin-Stammlösung

Wir verwendeten L-Thyroxin-Natriumsalz krist. der Firma Karl Roth, Karlsruhe.

Molekulargewicht von L-Thyroxin: 776,93.

Molekulargewicht von L-Thyroxin-Natriumsalz: 888,94.

7,90 mg L-Thyroxin Na^+ enthalten somit 7,0 mg L-Thyroxin

7,90 mg L-Thyroxin Na^+ ad 10 ml 0,1 n NaOH

1 ml davon wurden mit 9 ml 4% Albumin-KRB-Puffer versetzt.

1 ml dieser Stammlösung enthält dann 70 μ g L-Thyroxin.

1 ml dieser Stammlösung auf 650 ml Perfusionsmedium ergaben T_4 -Spiegel von $9,54 \pm 0,18$ μ g% ($n=10$) kompetitiver Proteinbindungsanalyse (4.1.3.).

2.2.4.4. Trijod-L-Thyroxin-Stammlösung

Wir verwendeten 3,3'5 Trijod-L-Thyronin, Firma Fluka, Molekulargewicht 650,98.

7 mg auf 100 ml einer 0,1 n NaOH

davon 0,5 ml in 50 ml eines 4%igen Albumin-KRB-Puffers gelöst

ergibt: 1 ml dieser Stammlösung enthält 0,7 μ g T_3 .

1 ml dieser Stammlösung auf 650 ml Perfusionsmedium ergibt eine

T₃-Konzentration von ca. 1 µg%. Diese wurde aus technischen Gründen nicht experimentell kontrolliert.

2.2.4.5. ¹²⁵J-Thyroxin- bzw. ¹²⁵J-Trijodthyronin-Stammlösung

Wir verwendeten ¹²⁵J-Thyroxin (bzw. ¹²⁵J-Trijodthyronin), das wir vom Radiochemical Centre, Amersham, England, erhielten.

1,15 µg ¹²⁵J-L-Thyroxin sind in ca. 2 ml Glycol gelöst, 1 ml der Lösung hat eine radioaktive Konzentration von 0,1-1,0 mCi/ml. Das ¹²⁵J befindet sich in Position 3' (bzw. 5') am Thyronin-Molekül. Weniger als 3% freies ¹²⁵J befindet sich ungebunden in der Lösung. Die Halbwertszeit des ¹²⁵J beträgt 60 Tage.

Die gesamte Lösung wurde in 250 ml Phosphat-Puffer (0,055 M) gelöst. 1 µl der Verdünnung enthielt ca. 25 000 cpm.

Die Menge, die jeweils zu unserem Perfusionsmedium als "Tracer" zugegeben wurde, ermittelten wir vor jedem Versuch empirisch (wegen der kurzen Halbwertszeit).

2 ml Perfusionsmedium ohne Erythrocyten sollten ca. 10 000 cpm enthalten. Dies galt sowohl für ¹²⁵J-L-Thyroxin wie für ¹²⁵J-L-Trijodthyronin.

2.2.4.6. 1ß-2ß-³H-Corticosteron-Stammlösung

Wir verwendeten 1ß-2ß-³H-Corticosteron des Radiochemical Centre, Amersham.

Tritium-markiertes Corticosteron mit einer Gesamtaktivität von 250 µCi wurden in 20 ml Äthanol gelöst und mit Aqua dest. auf 500 ml aufgefüllt.

10 ml dieser Stammlösung wurden unserem Standard-Perfusionsmedium als "Tracer" (650 ml) zugesetzt.

In 1 ml des Perfusionsmediums befanden sich dann 5 000 cpm.

2.3. Durchführung der Perfusion

Nachdem die Tiere wie unter 2.1. beschrieben, präpariert worden waren, schlossen wir den Perfusionsschlauch der Pumpe 2 (siehe 2.1.1.) an den Aortenkatheter an. Zwischen Unterbindung der Aorta und Anschluß an die Kammern vergingen nicht mehr als 2-3 Minuten;

die Ischämie-Phase war also sehr kurz. Die Pumpleistung der Pumpe 2 wurde auf 8 ml/min konstant eingestellt. Zum jeweils gleichen Zeitpunkt wurden arterielle und venöse 5-Minuten-Fraktionen gesammelt. Die arteriellen Fraktionen (ca. 10 ml) sammelten wir aus der arteriellen Abzweigung des Perfusions-schlauches (siehe 2.1.1.), die kurz vor dem Druckmeßröhrchen angebracht war.

Die venösen Fraktionen stammten aus dem Venenkatheter. Diese Fraktionen wurden in einem Meßzylinder abgemessen. Aus dem Volumen der venösen 5-Minuten-Fraktion errechneten wir die Durchblutung pro Minute.

Mittels eines auf 37° C temperierten Meßketten-pH-Meters der Firma WTW, Weilheim, bestimmten wir den pH-Wert jeder arteriellen und venösen Fraktion. Der Perfusionsdruck, der arterielle und der venöse pH-Wert und die Durchflußrate/min einer jeden 5-Minuten-Fraktion wurden protokolliert (Zeitschema vgl. Abb. 7 etc.). Das venöse Perfusat der ersten 15 Minuten wurde nicht ausgewertet ("wash-out-period"), da sich erst nach dieser Zeit ein steady-state des Stoffwechsels nach dem Operationsstreß und der Ischämie eingestellt hat (94). Nach diesen 15 Minuten sammelten wir 9 bzw. in einer Reihe von Versuchen 14 arterielle und venöse 5-Minuten-Fraktionen.

Wir führten Ruheversuche durch, in denen während der ganzen Perfusionsdauer die Muskulatur nicht gereizt wurde, und Arbeitsversuche, in denen die Arbeitsphase auf Fraktion 4 und 5 gelegt wurde (30. bis 40. Minute der Perfusion). In den verlängerten Versuchen (14 Fraktionen) fand die Arbeitsphase bei Fraktion 7 und dann wieder bei Fraktion 11 statt.

Um den Eigenstoffwechsel des Erythrozyten zu unterbinden, entnahmen wir sofort aus den fertig gesammelten Fraktionen (art. und ven.) 2 ml und pipettierten diese in 4 ml eisgekühlte Perchlorsäure. Daraus wurde noch am gleichen Tag des Versuches Glucose, Lactat und Pyruvat bestimmt. Der Rest der einzelnen Fraktionen wurde bei 3000 Upm 15 Minuten lang zentrifugiert und der Überstand zur späteren Bestimmung von NFS und Glycerin sowie der einzelnen Hormone bei - 20° C eingefroren.

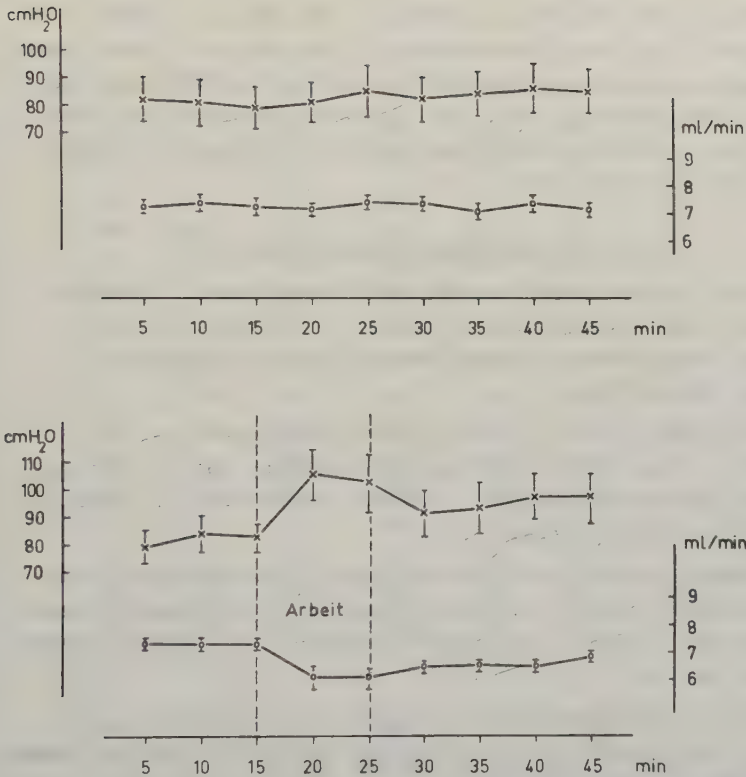


Abb. 7: Druck x---x in cm H₂O und Flußrate O---O in ml/min während Ruhe- und Arbeitsperfusion.

Bei einer Reihe von Versuchen wurde der Hämatokrit des arteriellen und venösen Perfusates bestimmt, um auszuschließen, daß Änderungen in den Substratkonzentrationen durch Differenzen von arteriellem und venösem Hämatokrit zustande kommen.

Die Bestimmung des Hämatokrits erfolgte mit heparinisierten, dünnwandigen Kapillaren (Durchmesser: 1 mm, Länge: 75 mm). Die Kapillaren wurden zu drei Viertel mit Perfusat gefüllt und das blutfreie Ende zugeschmolzen. Nach dem Zentrifugieren in einer hochtourigen Zentrifuge (5000 Upm) wurde der Hämatokrit mittels Millimetermaßstab bestimmt.

2.3.1. Auswertung der Perfusionsprotokolle

Wie unter 2.3. beschrieben, wurden Perfusionsdruck, "flow rate", arterieller und venöser pH-Wert und bei einer Reihe von Versuchen der arterielle und venöse Hämatokrit der einzelnen Fraktionen protokolliert.

Während der Ruheperfusion waren der Perfusionsdruck bei 83 cm H₂O (Tab. 1), der "blood flow" bei 7,30 ml/min (Tab. 2) und der arterielle und venöse pH-Wert (7,43 bzw. 7,40) über die Dauer der Perfusion konstant (Tab. 4).

Bei den Arbeitsperfusionen stieg zu Beginn der Arbeitsphase der Perfusionsdruck von $83 \pm 5,76$ cm H₂O auf $105 \pm 9,92$ cm H₂O signifikant an, und fiel dann langsam bis zum Ende der Erholungsphase wieder ab (Tab. 3).

Gleichzeitig fiel der "blood flow" von $7,35 \pm 0,12$ ml/min auf $6,10 \pm 0,25$ ml/min ab. Er stieg bis zum Ende der Perfusion wieder bis auf $6,88 \pm 0,26$ ml/min an (Tab. 5). Diesen Abfall des "blood flow" zu Beginn der Arbeitsphase interpretierten wir - da das arterielle Blutvolumen pro Minute unverändert blieb - als ein "Versacken" des Perfusats in den während der Arbeitsphase zusätzlich geöffneten Kapillargebieten und dilatierten Gefäßen (38, 50).

Tab. 1: Perfusionsdruck in cm H₂O der Ruhe-Perfusionen.

Ratte Nr.	R	R	R	R	R	R	R	R	R
68	79	79	79	83	92	98	100	105	110
70	100	80	82	87	82	110	75	94	105
72	172	142	132	120	150	90	138	162	132
74	142	168	170	170	170	170	170	170	170
75	61	78	69	72	77	68	77	82	75
76	109	111	118	120	137	130	118	109	120
77	58	62	64	71	72	71	68	70	68
78	85	85	45	58	61	58	60	42	40
79	52	53	55	50	51	52	58	59	60
81	81	74	78	80	84	88	88	88	92
84	54	52	54	55	54	53	54	56	49
85	62	62	63	68	65	68	68	67	63
86	80	78	79	79	78	78	77	79	78
87	68	69	70	69	71	72	75	76	73
88	62	65	64	65	65	66	67	72	81
89	48	46	46	60	55	52	52	52	52
$\bar{x}$	82	81	79	81	85	82	84	86	85
SD	34,28	32,90	33,61	30,98	35,66	31,91	32,63	36,04	34,49
S.E.M.	+ 8,57	+8,22	+8,40	+7,73	+8,91	+7,97	+8,15	+9,01	+8,62

Tab. 2: Ruheperfusion-"flow" (ml/min).

Ratte Nr.	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇	R ₈	R ₉
68	7,0	7,2	7,2	7,2	7,4	7,6	8,0	6,6	7,4
70	8,4	9,2	8,4	8,4	8,0	8,8	9,2	8,4	7,7
72	8,6	8,4	7,6	6,0	6,4	5,2	4,6	6,0	5,6
74	6,0	5,0	5,6	4,8	5,6	6,8	4,8	5,6	5,8
75	7,6	7,8	7,6	7,4	7,6	7,6	6,8	7,4	7,6
76	7,2	7,4	7,2	7,4	7,6	7,6	8,0	7,2	7,0
77	8,0	8,0	8,0	8,0	9,2	8,0	8,0	8,8	8,4
78	9,2	8,4	8,0	6,6	7,4	7,8	7,0	7,8	6,8
79	7,0	7,6	8,0	7,6	7,6	7,6	7,8	7,8	7,8
81	8,4	8,4	8,4	8,6	8,4	8,4	7,6	8,4	8,4
84	6,8	7,6	7,4	7,2	7,4	7,2	7,0	6,8	7,0
85	5,5	6,2	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	5,8
86	5,2	5,6	5,4	7,0	6,8	7,0	7,4	7,6	7,0
87	8,6	7,0	7,8	7,8	7,8	8,0	7,8	7,8	7,8
88	7,2	7,2	7,6	7,4	7,4	7,2	7,0	7,6	8,0
89	6,0	7,2	7,0	7,0	9,0	8,0	7,0	7,8	7,2
$\bar{x}$	7,29	7,38	7,32	7,15	7,47	7,42	7,12	7,35	7,20
SD	1,19	1,08	0,92	0,98	0,96	0,88	1,18	0,92	0,87
S.E.M.	$\pm 0,29$	$\pm 0,27$	$\pm 0,23$	$\pm 0,23$	$\pm 0,24$	$\pm 0,23$	$\pm 0,29$	$\pm 0,23$	$\pm 0,21$

Tab. 3: Perfusionsdruck in cm H₂O der Arbeits-Perfusionen

Ratte Nr.	R ₁	R ₂	R ₃	A ₁	A ₂	E ₁	E ₂	E ₃	E ₄
48	96	96	96	80	98	105	110	100	100
49	85	90	90	120	100	95	105	95	85
50	80	80	80	110	130	130	140	150	-
51	120	115	115	155	150	165	180	190	200
52	75	75	75	85	85	65	65	75	75
53	50	60	60	90	90	80	70	80	80
54	80	80	80	65	65	70	70	75	75
59	80	95	95	150	97	105	105	105	110
60	65	65	65	65	65	65	65	65	62
61	180	180	175	162	200	200	200	200	200
62	70	80	80	200	200	70	70	70	70
63	60	60	60	85	55	55	55	60	60
64	75	75	75	75	90	95	95	95	95
66	70	70	75	200	200	75	78	85	85
69	55	65	55	60	57	62	52	58	64
71	58	63	72	85	71	83	72	82	91
73	62	61	85	86	89	69	71	97	94
80	108	129	78	73	70	85	119	113	139
82	50	78	84	92	79	78	80	85	90
83	68	69	68	65	65	68	72	78	81
$\bar{x}$	79	84	83	105	102	91	93	97	97
SD	29,8	29,0	25,76	44,36	47,86	36,51	40,07	39,17	40,45
SEM	$\pm 6,67$	$\pm 6,49$	$\pm 5,76$	$\pm 9,92$	$\pm 10,70$	$\pm 8,16$	$\pm 8,96$	$\pm 8,76$	$\pm 9,28$

Tab. 4: pH-Wert Ruheperfusionen

Ratte Nr.	a	R _{1v}	a	R _{2v}	a	R _{3v}	a	R _{4v}
68	7,42	7,38	7,42	7,35	7,42	7,38	7,42	
70	7,38	7,37	7,38	7,37	7,38	7,37	7,38	7,39
72	7,42	7,40	7,42	7,40	7,42	7,41	7,42	7,40
75	7,45	7,42	7,45	7,43	7,45	7,43	7,45	7,40
77	7,48	7,45	7,48	7,46	7,48	7,46	7,48	7,46
78	7,50	7,48	7,50	7,48	7,50	7,47	7,50	7,50
79	7,40	7,36	7,40	7,34	7,40	7,33	7,40	7,33
81	7,48	7,44	7,48	7,42	7,48	7,42	7,48	7,44
85	7,44	7,45	7,44	7,40	7,44	7,41	7,44	7,37
87	7,45	7,41	7,45	7,44	7,45	7,42	7,45	7,41
88	7,42	7,41	7,42	7,41	7,42	7,40	7,42	7,39
89	7,32	7,30	7,32	7,29	7,32	7,29	7,32	7,26
90	7,45	7,43	7,45	7,41	7,45	7,43	7,45	7,39
94	7,49	7,42	7,49	7,45	7,49	7,45	7,49	7,43
X	7,43	7,40	7,43	7,40	7,43	7,40	7,43	7,39
SEM	$\pm 0,0136$	$\pm 0,0136$	$\pm 0,0130$	$\pm 0,015$	$\pm 0,013$	$\pm 0,017$	$\pm 0,013$	$\pm 0,016$

a	R _{5v}	a	R _{6v}	a	R _{7v}	a	R _{8v}	a	R _{9v}
7,42	7,35	7,42	7,38	7,42	7,38	7,42	7,38	7,42	7,38
7,38	7,38	7,38	7,38	7,38	7,39	7,38	7,41	7,38	7,38
7,42	7,41	7,42	7,41	7,42	7,41	7,42	7,42	7,42	7,39
7,45	7,41	7,45	7,37	7,45	7,39	7,45	7,37	7,45	7,39
7,48	7,46	7,48	7,42	7,48	7,47	7,48	7,43	7,48	7,48
7,50	7,49	7,50	7,48	7,50	7,48	7,50	7,48	7,50	7,48
7,40	7,32	7,40	7,31	7,40	7,30	7,40	7,32	7,40	7,35
7,48	7,45	7,48	7,45	7,48	7,45	7,48	7,45	7,48	7,45
7,44	7,40	7,44	7,40	7,44	7,39	7,44	7,35	7,44	7,38
7,45	7,42	7,45	7,44	7,45	7,45	7,45	7,44	7,45	7,43
7,42	7,38	7,42	7,40	7,42	7,36	7,42	7,37	7,42	7,34
7,32	7,25	7,32	7,22	7,32	7,22	7,32	7,22	7,32	7,22
7,45	7,39	7,45	7,40	7,45	7,40	7,45	7,40	7,45	7,39
7,49	7,40	7,49	7,40	7,49	7,41	7,49	7,43	7,49	7,42
7,43	7,39	7,43	7,39	7,43	7,39	7,43	7,39	7,43	7,39
<u>+0,013</u>	<u>+0,017</u>	<u>+0,013</u>	<u>+0,017</u>	<u>+0,013</u>	<u>+0,017</u>	<u>+0,013</u>	<u>+0,017</u>	<u>+0,013</u>	<u>+0,017</u>

Tab. 5: Arbeits-Perfusionen "flow" (ml/min).

Ratte Nr.	R ₁	R ₂	R ₃	A ₁	A ₂	E ₁	E ₂	E ₃	E ₄
48	8,0	8,4	8,4	6,8	6,4	6,4	6,8	7,0	7,0
49	7,0	7,2	7,2	4,8	4,8	5,2	4,8	5,2	5,0
50	6,4	6,4	6,4	5,6	3,2	5,2	5,6	5,6	-
51	7,6	7,6	7,6	7,0	7,0	6,6	6,4	4,6	3,2
52	7,6	7,6	7,6	5,4	5,6	6,0	6,0	6,0	6,0
53	7,2	6,8	7,6	4,0	4,4	6,8	6,8	6,8	6,8
54	7,0	7,0	7,0	6,4	6,0	6,0	6,4	6,4	6,4
59	5,6	5,6	6,2	5,6	5,0	6,2	6,0	6,0	6,0
60	8,0	8,2	8,4	6,0	5,6	6,0	6,2	6,4	6,4
61	7,2	7,2	7,0	6,8	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0
62	7,2	7,2	7,2	4,4	5,6	7,2	6,4	6,2	6,2
63	7,6	8,4	7,6	7,2	7,6	8,0	8,0	8,0	7,6
64	7,6	7,6	7,6	7,2	7,2	7,2	7,6	7,6	7,6
66	6,8	6,8	6,8	5,6	6,8	7,4	6,8	6,8	6,8
69	7,8	8,6	7,4	6,6	7,6	7,6	7,0	7,0	7,2
71	6,4	6,8	7,6	6,2	7,2	7,0	7,2	6,8	6,8
73	8,6	6,6	6,6	6,6	6,4	6,8	6,4	6,4	6,8
80	8,0	8,0	7,0	4,4	4,8	4,0	6,2	6,4	8,6
82	7,2	7,4	7,6	8,8	8,0	7,0	7,0	7,2	7,2
83	8,2	8,4	7,8	6,6	6,2	7,2	7,2	7,4	7,6
$\bar{x}$	7,35	7,39	7,35	6,10	6,07	6,49	6,54	6,49	6,88
SEM	$\pm 0,15$	$\pm 0,17$	$\pm 0,12$	$\pm 0,25$	$\pm 0,27$	$\pm 0,21$	$\pm 0,16$	$\pm 0,18$	$\pm 0,26$

Zusammengefaßt in

	Ruhe	Arbeit	2 x 10 min Erholung
	7,35	6,08	6,51
	$\pm 0,08$	$\pm 0,18$	$\pm 0,11$
Signifikanzen:	Ruhe/Arbeit	Arbeit/Erholung 1/2	Arbeit/Erholung 3/4
	p 0,0005	p 0,05	p 0,025

Tab. 5a: Flußrate bei verlängerter Arbeitsperfusion in ml/min.

Nr.	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	A ₁	E ₁	E ₂	E ₃	A ₂	E ₁ -	E ₂	E ₃
95	8,0	8,4	7,6	7,0	7,4	7,2	7,0	7,0						
97	7,6	7,6	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0	8,2	8,4	8,4	8,0	8,0	8,0
98	8,2	7,8	8,0	7,6	7,2	7,4	7,4	7,6	8,0	7,2	7,2	7,0	7,0	7,0
99	8,0	8,0	7,8	8,0	7,6	7,6	7,4	7,0	7,6	6,8	6,4	6,2	6,0	4,8
100	7,2	7,6	8,0	7,6	8,0	8,2	7,6	8,4	8,0	8,2	8,0	8,0	8,0	8,0
$\bar{x}$	7,80	7,88	7,88	7,76	7,56	7,72	7,52	7,60	7,76	7,65	7,50	7,30	7,25	6,95
SEM	+0,17	+0,14	+0,07	+0,09	+0,20	+0,16	+0,13	+0,27	+0,21	+0,38	+0,44	+0,43	+0,47	+0,75

Tab. 6: pH-Werte Arbeitsperfusionen

Nr.	R ₁ v		R ₂ v		R ₃ v		A ₁ v		A ₂ v		E ₁ v		E ₂ v		E ₃ v		E ₄ v	
	a	R ₁ v	a	R ₂ v	a	R ₃ v	a	A ₁ v	a	A ₂ v	a	E ₁ v	a	E ₂ v	a	E ₃ v	a	E ₄ v
44	7,40	7,35	7,40	7,35	7,40	7,35	7,40	7,25	7,40	7,30	7,45	7,25	7,45	7,30	7,45	7,45	7,45	7,45
45	7,45	7,45	7,45	7,45	7,45	7,48	7,45	7,38	7,45	7,38	7,45	7,45	7,45	7,19	7,29	7,45	7,45	7,45
49	7,29	7,29	7,29	7,29	7,29	7,29	7,29	7,12	7,29	7,06	7,29	7,11	7,29	7,19	7,29	7,25	7,29	7,25
50	7,34	7,34	7,34	7,34	7,34	7,34	7,34	7,19	7,34	7,17	7,34	7,22	7,34	7,22	7,34	7,25	7,34	7,25
51	7,31	7,31	7,31	7,31	7,31	7,31	7,31	7,21	7,31	7,20	7,31	7,24	7,31	7,25	7,25	7,31	7,31	7,27
52	7,29	7,29	7,29	7,29	7,29	7,29	7,29	7,14	7,29	7,03	7,29	7,07	7,29	7,14	7,29	7,19	7,29	7,21
53	7,43	7,40	7,43	7,40	7,43	7,40	7,43	7,29	7,43	7,13	7,43	7,16	7,43	7,26	7,43	7,29	7,43	7,36
54	7,35	7,35	7,35	7,35	7,35	7,35	7,35	7,15	7,35	7,07	7,35	7,13	7,35	7,25	7,35	7,25	7,35	7,29
55	7,36	7,37	7,36	7,39	7,36	7,39	7,36	7,18	7,36	7,09	7,36	7,14	7,35	7,25	7,35	7,25	7,35	7,29
56	7,40	7,41	7,40	7,42	7,40	7,43	7,40	7,24	7,40	7,06	7,40	7,15	7,40	7,23	7,40	7,26	7,40	7,31
57	7,40	7,45	7,40	7,45	7,40	7,45	7,40	7,18	7,40	7,07	7,40	7,14	7,40	7,23	7,40	7,26	7,40	7,31
58	7,39	7,44	7,39	7,44	7,39	7,44	7,39	7,31	7,39	7,18	7,39	7,29	7,39	7,31	7,38	7,25	7,38	7,28
59	7,40	7,39	7,40	7,40	7,40	7,40	7,40	7,29	7,38	7,14	7,38	7,19	7,38	7,23	7,38	7,25	7,35	7,29
60	7,35	7,35	7,35	7,35	7,35	7,35	7,35	7,23	7,35	7,18	7,35	7,22	7,35	7,28	7,35	7,27	7,35	7,29
61	7,35	7,31	7,36	7,31	7,35	7,31	7,35	7,24	7,35	7,20	7,35	7,20	7,35	7,22	7,35	7,24	7,35	7,24
62	7,42	7,37	7,42	7,42	7,42	7,41	7,42	7,24	7,42	7,15	7,42	7,27	7,42	7,31	7,42	7,32	7,42	7,34
63	7,38	7,37	7,38	7,36	7,38	7,36	7,38	7,24	7,38	7,13	7,38	7,15	7,38	7,20	7,38	7,26	7,38	7,29
64	7,39	7,18	7,39	7,29	7,36	7,31	7,36	7,11	7,36	7,15	7,36	7,17	7,36	7,19	7,36	7,19	7,36	7,21
65	7,49	7,49	7,49	7,50	7,49	7,49	7,49	7,17	7,49	7,39	7,49	7,39	7,49	7,35	7,49	7,37	7,49	7,38
66	7,38	7,37	7,38	7,37	7,38	7,38	7,38	7,17	7,38	7,13	7,38	7,17	7,38	7,23	7,38	7,28	7,38	7,29
69	7,45	7,42	7,45	7,41	7,45	7,42	7,45	7,23	7,45	7,17	7,44	7,27	7,44	7,34	7,44	7,37	7,44	7,38
73	7,35	7,33	7,35	7,38	7,35	7,39	7,35	7,25	7,35	7,20	7,35	7,25	7,35	7,27	7,35	7,29	7,35	7,33
80	7,44	7,38	7,44	7,40	7,44	7,38	7,44	7,29	7,44	7,20	7,44	7,25	7,44	7,26	7,44	7,30	7,44	7,35
82	7,49	7,39	7,49	7,45	7,48	7,45	7,49	7,36	7,49	7,32	7,49	7,33	7,49	7,36	7,49	7,38	7,49	7,38
83	7,50	7,50	7,50	7,48	7,50	7,52	7,50	7,39	7,50	7,35	7,50	7,36	7,50	7,43	7,50	7,48	7,50	7,51
x	7,39	7,37	7,39	7,38	7,39	7,37	7,39	7,24	7,39	7,17	7,39	7,22	7,39	7,27	7,39	7,29	7,39	7,32
SEM	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01

Tab. 7: Hämatokrit in %, gemessen mit Hämatokrit-Kapillarröhrchen bei 7 Arbeitsperfusionen.

Nr.	a	R ₁ v	a	R ₂ v	a	R ₃ v	a	A ₁ v	a	A ₂ v	a	E ₁ v	a	E ₂ v	a	E ₃ v	a	E ₄ v
47	24	23	24	24	23	24	25	24	24	22	24	25	-	-	-	-	-	-
53	25	25	25	25	25	26	25	25	25	26	25	25	26	25	25	25	25	25
54	24	24	24	24	24	24	24	24	25	24	25	25	24	24	24	24	24	24
55	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
56	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
57	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	-	-	-	-	-	-
58	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	-	-	-

$\bar{x}$ 24,3 24,1 24,3 24,3 24,1 24,4 24,4 24,3 24,4 24,1 24,4 24,6 25,0 24,9 24,7 24,7 24,7 24,7
 SEM $\pm$ 0,42 $\pm$ 0,45 $\pm$ 0,42 $\pm$ 0,42 $\pm$ 0,45 $\pm$ 0,40 $\pm$ 0,42 $\pm$ 0,45 $\pm$ 0,42 $\pm$ 0,45 $\pm$ 0,42 $\pm$ 0,45 $\pm$ 0,40 $\pm$ 0,42 $\pm$ 0,39 $\pm$ 0,39 $\pm$ 0,39 $\pm$ 0,39

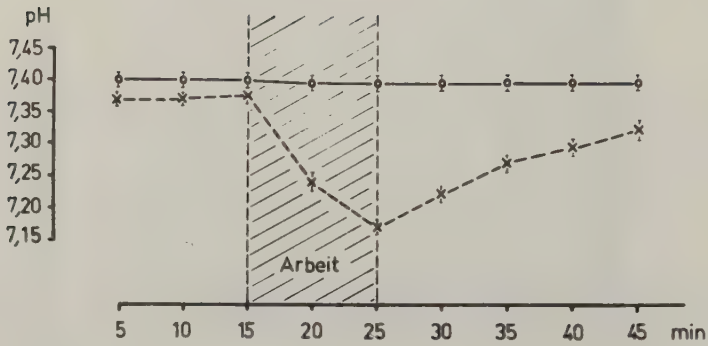


Abb.8 Venöser pH-Wert bei Ruheperfusionen $\circ-\circ$ ($n=14$) und bei Arbeitperfusionen $\times-\times$ ($n=25$)

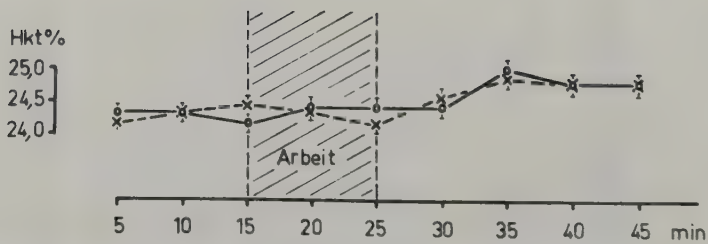


Abb.9 Hämatokrit (Hkt%) art. $\circ-\circ$ und ven. $\times-\times$ ($n=7$) bei Ruhe, Arbeit und in der Erholungsphase

2.4. Berechnung des Substratumsatzes
der Muskulatur

Der Substratumsatz des perfundierten Gewebes ergibt sich aus der arterio-venösen Konzentrationsdifferenz der einzelnen Substrate, multipliziert mit der Flußrate pro Zeiteinheit. Nach den Untersuchungen von RUDERMANN et al. (94) steht die perfundierte Muskulatur dieses Modells in einem festen Verhältnis zum Körpergewicht des Untersuchungstieres:

$$\text{Perfundierte Muskulatur (M)} = \frac{\text{Körpergewicht der Ratte (KG)}}{6,03 \pm 0,10}$$

Für eine 181 g schwere Ratte ergibt sich damit ein perfundiertes Muskelgewicht von 30 g. Da die Gewichte der untersuchten Tiere schwankten, wurden alle Ergebnisse um diesen Faktor korrigiert (und damit auf 30 g Muskulatur bezogen).

Der Substratumsatz (SU) berechnet sich demnach:

$$\text{SU} = (a - v) \times f \times \frac{30 \text{ g}}{\text{M}} \quad (\mu\text{mol/min/30 g})$$

a = arterielle Konzentration in $\mu\text{mol/ml}$

v = venöse Konzentration in $\mu\text{mol/ml}$

f = Flußrate in ml/min

M = perfundierte Muskulatur

Anmerkung: Voraussetzung für die Gültigkeit dieser Formel ist die Gleichheit von arteriellem "inflow" und venösem "outflow" der perfundierten Muskulatur; während der Muskelkontraktionen ist diese Voraussetzung nicht immer sicher erfüllt (siehe Tab. 1). Fällt bei gleichbleibendem arteriellem "inflow" der venöse "outflow" ab, so ändert sich die Konzentration der Hormone und Substrate im venösen Schenkel. Durch solche Verdünnungseffekte wird der Substratumsatz während der Muskelkontraktionen evtl. zu niedrig bemessen (siehe auch 5.1.).

2.4.1. Statistik

Mittelwert ($\bar{x}$), Standardabweichung (SD) und Standardabweichung des Mittelwerts (SEM) wurden mit einem Olivetti-Tischcomputer ermittelt. Für die statistischen Berechnungen wurde der t-Test nach Student (26) verwendet.

3. DER MUSKELSTOFFWECHSEL
in Ruhe und während Arbeit
zur Überprüfung der Validität des Modells

Zur Überprüfung der Integrität des perfundierten Gewebes - zu etwa 80% Muskulatur (20% Knochen, Bindegewebe und Fett) (94) - , wurde der Umsatz von Glucose, Lactat, Pyruvat sowie Glycogen als Parameter des Kohlenhydratstoffwechsels, NFS und Glycerin als Parameter des Fettstoffwechsels während Ruhe und bei kurzfristiger Muskularbeit sowie in der sofort folgenden Erholungsphase gemessen. Der Vergleich der dabei gewonnenen Ergebnisse mit denen anderer Untersucher am gleichen Modell sowie der Ergebnisse in vivo am gleichen Versuchstier läßt Rückschlüsse über die physiologische Richtigkeit unseres Versuchsaufbaus und damit eine Wertung der Ergebnisse über das Verhalten der untersuchten Hormone am peripheren Gewebe zu.

3.1. Stoffwechselparameter, Bestimmungsmethoden

3.1.1. Bestimmung von Glucose, Lactat, Pyruvat und Glycogen

Glucose bestimmten wir enzymatisch nach der Methode von M.W.SLEIN (96, 97). Enzyme und Puffer entnahmen wir der Boehringer Biochemica Test combination (Best.Nr. 15931). Wir erzielten mit dieser Methode in Vorversuchen bei 10-er Bestimmungen einen Variationskoeffizienten (VK) von weniger als 2% ($\bar{x} = 195,1 \text{ mg\%}$).

Lactat bestimmten wir enzymatisch in Anlehnung an die von H.J.HOHRST (51) angegebene Methode (Boehringer Biochemica Test Combination, Best.Nr. 15972). Hierbei erzielten wir in Vorversuchen bei 10-er Bestimmungen einen VK von 2% ($\bar{x} = 15,2 \text{ mg\%}$).

Den Glykogengehalt der Muskulatur (es wurde immer der M.quadriceps verwendet) bestimmten wir nach der colorimetrischen Methode von A.KEMP und A.J.M.KITS van HEIJNINGEN (60). Muskelstücke von ca. 50 mg wurden in einer Lösung aus 0,1% Ag_2SO_4 und 5% Trichloressigsäure erhitzt. Dabei geht das Muskelglykogen

in Lösung. Dieses ergibt mit 96% H_2SO_4 eine Farbreaktion, die im Eppendorf-Photometer bei 546 nm gegen Aqua bidest. als Leerwert gemessen wird. Mittels einer Eichkurve kann die Glykogenkonzentration ermittelt werden.

3.1.2. Bestimmung der freien Fettsäuren und Glycerin

Die NFS-Konzentrationen bestimmten wir in Anlehnung an die Methode von W.G. DUNCOMBE (29, 32). Hierbei erzielten wir in Vorversuchen einen VK von 1,5% ($\bar{x}$ = 605 mval/l).

Die Glycerinbestimmung erfolgte enzymatisch nach der Methode von F.H.KREUTZ (67). Es wurde von uns ein VK von 3,3% erzielt.

3.1.3. Kohlenhydratstoffwechsel

Unter Ruhebedingungen fanden wir ohne Insulinzusatz zum Perfusionsmedium und bei einer arteriellen Glucosekonzentration von 195 mg% = 10,83 $\mu\text{mol/l}$ eine mittlere Glucoseaufnahme von $1,66 \pm 0,19 \mu\text{mol/min/30 g Gewebe}$; mit Zusatz von 150 $\mu\text{E/ml}$ Insulin stieg die Glucoseaufnahme statistisch signifikant auf $4,26 \pm 0,30 \mu\text{mol/min/30 g Gewebe}$ an. Diese Ergebnisse decken sich gut mit denen anderer Arbeitsgruppen (9, 86, 94). Gegen Ende der Ruheperfusion fand sich in beiden Fällen ein statistisch signifikanter Anstieg der Glucoseaufnahme auf $2,81 \pm 0,46 \mu\text{mol/min/30 g Gewebe}$ (ohne Insulinzusatz) bzw. auf $5,40 \pm 0,46 \mu\text{mol/min/30 g Gewebe}$ (mit Insulinzusatz). Auch diese Beobachtung wurde von anderen Untersuchern bereits gemacht (9, 94). Die gleichzeitige Lactatproduktion lag bei den Untersuchungen ohne Insulin bei $1,68 \pm 0,13 \mu\text{mol/min/30 g Gewebe}$; mit 150 $\mu\text{E/ml}$ Insulin im Perfusat fand sich eine geringe Mehrproduktion an Lactat, $1,96 \pm 0,29 \mu\text{mol/min/30 g Gewebe}$. Bis zum Ende der Ruheperfusion stieg der Lactatproduktion auf $2,29 \pm 0,26 \mu\text{mol/min/30 g Gewebe}$ bzw. auf $2,45 \mu\text{mol/min/30 g Gewebe}$ an (siehe Tabelle 23/24 und Abbildung 10).

Da die Flußrate und der Perfusionsdruck (Tabelle 1, 2 und Abbildung 7) über die Untersuchungsdauer konstant gehalten wurden, scheiden Änderungen der Mikrozirkulation (48, 50) oder Änderungen des interstitiellen Raumes (64, 74) als Ursache für diesen Substratmehrumsatz über die Perfusionsdauer aus. Bei einem mittleren venösen

pO_2 von $41,6 \pm 1,8$ mm Hg am Ende der Ruheperfusion ist der kritische venöse O_2 -Druck von ca. 20 mm Hg bei weitem nicht unterschritten (48), so daß auch eine relative Hypoxämie als Ursache für die gering gesteigerte Glucoseaufnahme und Lactatproduktion unwahrscheinlich ist. Ob mit steigender Perfusionsdauer der Eigenstoffwechsel der Erythrocyten immer mehr in den Vordergrund rückt und somit eine Steigerung des Kohlenhydratstoffwechsels vorspiegelt, kann nur vermutet werden, bietet sich aber als wahrscheinlichste und einfachste Erklärung an.

Kurz nach dem Einsetzen von Muskelkontraktionen fand sich ein Anstieg der Glucoseaufnahme, sowohl mit Insulin als auch ohne Insulinzusatz zum Perfusionsmedium, nämlich $3,02 \pm 0,32$ $\mu\text{mol}/\text{min}/30$ g Gewebe bzw. $5,62$ $\mu\text{mol}/\text{min}/30$ g Gewebe. In beiden Fällen ist die Glucoseaufnahme signifikant höher als sie unter Ruhebedingungen gefunden wurde. Die Muskelkontraktion per se führt somit allein zu einer gesteigerten Glucoseaufnahme; dem Insulin kommt allerdings ein deutlich additiver Effekt zu (9). Die Lactatproduktion war mit und ohne Insulinzusatz nicht voneinander unterschieden, nämlich $14,33 \pm 1,15$ $\mu\text{mol}/\text{min}/30$ g Gewebe bzw. $13,59 \pm 1,52$ $\mu\text{mol}/\text{min}/30$ g Gewebe. Dieser hochsignifikante Anstieg der Lactatproduktion während der Muskularbeit war erwartet und muß als typisch bezeichnet werden (Abbildung 10, 12 und Tabelle 25/26).

Trotz der unter Insulin vermehrten Glucoseaufnahme findet sich bei Muskularbeit keine Steigerung der Lactatproduktion (gegenüber gleichen Untersuchungen ohne Insulinzusatz), was darauf hinweist, daß der größere Anteil des anfallenden Lactats aus dem Abbau muskeleigenen Glycogens stammt. Da die verschiedenen Muskeln unterschiedlichen Glycogengehalt haben (siehe Tabelle 16), wurden, um vergleichbare Ergebnisse zu bekommen, alle Untersuchungen am M. quadriceps durchgeführt. Der mittlere Glycogengehalt der Muskulatur liegt sofort nach Tötung des Tieres bei $4,43 \pm 0,11$ mg/g Feuchtgewicht; nach 30-minütiger Ruheperfusion (mit 150 uE/ml Insulin im Perfusat) fand sich ein hochsignifikanter Anstieg auf $4,79$ mg/g Feuchtgewicht. Die sofort angeschlossene 10-minütige Arbeitsphase führte zu einem hochsignifikanten Abfall des Glycogengehalts der Muskulatur auf $3,06 \pm 0,22$ mg/g Feuchtgewicht. Dieser Abfall paßt zu der Steigerung der Lactatproduktion während der

Muskelkontraktion. Ähnliche Ergebnisse sind sowohl bei Untersuchungen am Menschen (2) als beim Hund (22) erhoben worden.

In der an die Arbeitsphase anschließenden Erholungsphase sinkt die Lactatproduktion langsam auf $8,28 \pm 0,59 \mu\text{mol/min/30 g Gewebe}$ bzw. auf $7,47 \pm 1,20 \mu\text{mol/min/30 g Gewebe}$ ab. Im Gegensatz dazu steigt die Glucoseaufnahme in der Erholungsphase nochmals deutlich auf $4,88 \pm 0,37 \mu\text{mol/min/30 g Gewebe}$ (ohne Insulin) bzw. auf $6,89 \pm 0,67 \mu\text{mol/min/30 g}$ (mit Insulin) an. Dieses Verhalten zeigt, daß in der Ruhephase die intramuskulären Energiereserven wiederaufgebaut werden, ein Verhalten, wie es mehrfach beschrieben wurde (11, 27, 62, 82).

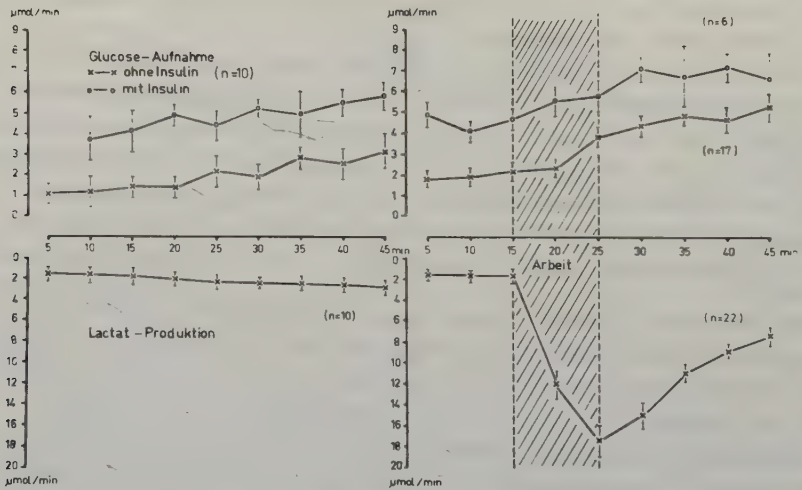


Abb. 10: Vergleich von Ruhe- und Arbeitsperfusion; Glucoseaufnahme und Lactatproduktion in $\mu\text{mol/min/30 g Gewebe}$ mit O---O Insulin und ohne X---X Insulin im Perfusionsmedium.

Tab. 9: Glucoseaufnahme in $\mu\text{mol}/\text{min}/30 \text{ g}$ Gewebe während 45-minütiger Ruheperfusion mit Zusatz von $150 \mu\text{E}/\text{ml}$ Insulin zum Perfusionsmedium.

Nr.	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇	R ₈	R ₉
41		5,93	6,00	4,53	5,76	6,21	7,28	6,80	7,00
43		3,26	3,97	6,07	3,23	5,18	3,77	5,09	4,37
81	1,09	1,82	2,51	4,15	4,25	4,21	3,88	4,57	5,83
N	1	3	3	3	3	3	3	3	3
$\bar{x}$	1,09	3,67	4,16	4,92	4,41	5,20	4,98	5,49	5,73
SD		2,085	1,753	1,019	1,273	1,001	1,996	1,169	1,318
SEM		0,204	1,012	0,587	0,735	0,577	1,152	0,674	0,761

Tab. 10: Glucoseaufnahme in $\mu\text{mol}/\text{min}/30 \text{ g}$ Gewebe während 45-minütiger Ruheperfusion ohne Insulinzusatz zum Perfusionsmedium.

Nr.	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇	R ₈	R ₉
68	4,16	6,40	4,84	3,60	5,34	4,01	4,84	4,36	7,15
70	2,06		1,79	0,41	1,31	1,10	3,62	5,75	5,06
72	-1,14	-1,41	-0,88	-1,00	-0,91	-0,22	-0,02	-0,15	-0,39
75	-1,03	-1,36	0,39	1,85	2,91	2,18	2,45		
76	0,24	0,44	0,24	0,00	1,44	0,94	1,37	1,54	1,45
77	1,23	1,13	2,13	3,82	3,28	1,68	2,96	2,61	3,07
78	-1,15	-0,67	0,22	0,16	0,47	0,75			
79	1,55	1,80	3,01	2,95	4,75	6,76	7,05		
87	-1,17	0,28	-0,22	0,65	1,03	0,67	-0,12	0,59	1,97
88	3,82	2,95	2,75	2,29	3,44	2,02	2,59	4,06	
90	2,93	1,86	1,91		2,01	1,63	2,60	1,86	2,96
91	-0,07	-1,15	0,94	0,76					
92	2,74	3,90							
N	13	12	12	11	11	11	10	8	7
$\bar{x}$	1,09	1,18	1,43	1,41	2,28	1,96	2,74	2,62	3,15
SD	1,954	2,374	1,623	1,591	1,870	1,927	2,144	1,959	2,295
SEM	0,542	0,685	0,469	0,480	0,564	0,581	0,678	0,693	0,867

Tab. 11: Lactatproduktion in $\mu\text{mol}/\text{min}/30 \text{ g}$ Gewebe während 45-minütiger Ruheperfusion mit Zusatz von $150 \mu\text{E}/\text{ml}$ Insulin (oben) und ohne Zusatz von Insulin zum Perfusionsmedium.

Ratte Nr.	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇	R ₈	R ₉
41	-	3,50	2,03	2,36	2,45	3,16		3,55	3,32
43	-	2,28	1,25	0,99	1,16	0,71	2,35	1,62	1,41
81	3,56	3,32	3,96						
	3,56	3,03	2,41	1,68	1,81	1,94	2,35	2,59	2,37
Ratte Nr.	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇	R ₈	R ₉
68	1,06	1,94	2,05	2,54	2,12	1,55	2,97	2,98	3,46
72	0,42	0,42	1,03	1,12	0,99	0,71	0,86	1,36	1,44
75	1,27	1,91	2,73	2,33	2,52	3,28	3,76		
76	2,34	2,22	2,61	3,29	3,08	3,00	3,03	3,01	3,28
77	1,62	0,84	1,91	1,90	3,42	2,45	2,90	3,22	2,92
78	2,05	1,54	1,17	1,85	2,39	3,40			
79	0,73	1,41	1,62	1,90	2,77	3,14	3,23		
87	0,62	0,37	0,28	0,31	0,23	0,23	0,09	0,05	0,02
88	1,70	2,23	3,60	2,03	2,67	2,73	2,89	3,95	
90	0,74	0,76	0,14	1,04	1,33	1,43	1,46	1,45	2,14
91	2,81	2,92	3,41	3,87					
92	3,17	3,52							
N	12	12	11	11	10	10	9	7	6
$\bar{x}$	1,54	1,67	1,87	2,02	2,15	2,19	2,35	2,29	2,21
SD	0,899	0,981	1,160	1,008	1,002	1,135	1,241	1,366	1,312
SEM	0,289	0,383	0,349	0,304	0,317	0,359	0,414	0,516	0,536

Tab. 12: Glucoseaufnahme in $\mu\text{mol}/\text{min}/30$ g Gewebe während Ruhe, 10-minütiger Arbeit und in der Erholungsphase unter Zusatz von $150 \mu\text{E}/\text{ml}$ Insulin.

Ratte Nr.	R ₁	R ₂	R ₃	A ₁	A ₂	E ₁	E ₂	E ₃	E ₄
13	6,62	3,17	4,75	7,23	7,30	7,89	8,94	5,61	4,42
47	4,90	4,38	3,48	5,42	5,93	6,49			
49	5,83	5,83	6,73	3,54	6,27	7,07	2,87	6,62	6,05
50	2,46	2,37	3,46	4,21	2,19	4,26	6,18	7,21	
54	4,10	3,71	5,06	8,05	7,33	8,15	8,76	9,15	9,15
55	5,50	4,71	4,76	4,54	5,41	8,47			
N	6	6	6	6	6	6	4	4	3
$\bar{x}$	4,90	4,03	4,71	5,50	5,74	7,06	6,69	7,15	6,54
SD	1,468	1,218	1,207	1,785	1,897	1,551	2,840	1,490	2,403
SEM	0,599	0,497	0,493	0,729	0,774	0,633	1,420	0,745	1,387

Tab. 13: Glucoseaufnahme in $\mu\text{mol}/\text{min}/30$ g Gewebe während Ruhe, 10-minütiger Arbeit und in der Erholungsphase ohne Insulin-zusatz zum Perfusionsmedium.

Ratte Nr.	R ₁	R ₂	R ₃	A ₁	A ₂	E ₁	E ₂	E ₃	E ₄
40	0,48	0,08	0,42	2,72	0,78	0,78	2,98	2,48	1,88
45	4,62	5,39	6,26	1,85	3,54	1,40	2,90	2,54	3,10
		3,35	1,17	3,90	2,81	4,08	7,00	2,70	6,78
48	4,30	1,25	2,42	2,63	2,32	2,23	2,94	3,55	2,85
51	0,35	0,76	2,59	1,92	1,87	5,12	6,30	4,77	3,21
53	1,77	1,67	2,55	1,52	2,89	5,25	5,29	5,91	7,10
56	1,21	2,31	2,53	3,59	4,54	3,73	3,93	4,91	4,15
57	2,26	1,62	1,83	0,70	5,23	5,04			
58	0,91	0,96	1,27	1,66	2,99	3,15	3,01		
59	2,78	3,26	3,71	6,07	5,96	7,93	8,18	8,68	8,78
60	0,67	0,50	0,88	0,45	1,45	2,05	3,17	3,30	4,86
61	0,58	0,70	0,60	2,62	2,46	2,88	3,20	3,04	3,69
62	-1,01	2,60	0,48	0,32	4,27	5,74	4,15	5,39	5,97
66	2,41	2,45	4,23	3,41	7,65	9,31	7,97	8,06	8,97
69	3,69	3,52	2,40	1,85	6,91	5,73	6,36	6,54	5,51
80	1,17	0,20	1,72	1,49	5,54	3,22	3,34	4,02	4,63
83	2,62	2,57	2,12	1,87	2,85	5,91	6,13	3,14	5,91
N	16	17	17	17	17	17	16	15	15
$\bar{x}$	1,80	1,95	2,19	2,27	3,77	4,33	4,80	4,60	5,19
SD	1,550	1,424	1,502	1,422	1,949	2,266	1,917	1,980	2,122
SEM	0,387	0,354	0,364	0,345	0,473	0,549	0,479	0,511	0,548

Tab. 14: Lactatproduktion in $\mu\text{mol}/\text{min}/30 \text{ g}$ Gewebe während Ruhe, 10-minütiger Arbeit und in der Erholungsphase unter Zusatz von $150 \mu\text{E}/\text{ml}$ Insulin zum Perfusionsmedium.

Ratte Nr.	R ₁	R ₂	R ₃	A ₁	A ₂	E ₁	E ₂	E ₃	E ₄
13	1,58	1,67	3,69	5,28	13,11	10,52	6,61	6,30	1,97
47	2,58	2,29	6,13	12,13	11,05	9,24			
49	1,25	1,68	1,63	13,86	19,88	16,72	13,54	8,35	6,21
50	0,83	1,44	1,46	11,65	9,89	11,80	6,40	7,58	
54	0,88	0,41	1,13	18,25	22,05	21,64	15,52	11,89	10,01
55	0,17	0,08	0,26	6,75	19,14	22,08			
N	6	6	6	6	6	6	4	4	3
$\bar{x}$	1,22	1,26	2,38	11,32	15,85	15,33	10,52	8,35	6,06
SD	0,819	0,843	2,156	4,746	5,130	5,657	4,704	2,394	4,018
SEM	0,334	0,344	0,880	1,937	2,094	2,309	2,352	1,197	2,320

Tab. 15: Lactatproduktion in $\mu\text{mol}/\text{min}/30 \text{ g}$ Gewebe während Ruhe, 10-minütiger Arbeit und in der Erholungsphase ohne Insulinzusatz zum Perfusionsmedium.

Ratte Nr.	R ₁	R ₂	R ₃	A ₁	A ₂	E ₁	E ₂	E ₃	E ₄
40	1,94	2,86	2,54	9,54	12,48	15,77	11,23	11,51	7,50
45	1,70	1,96	2,10	11,43	14,05	10,27	5,33	3,00	3,04
46	2,10	1,24	2,80	10,17	13,87	9,18	7,32	5,82	
48	2,18	3,13	3,70	12,52	18,79	17,04	13,55	11,75	11,04
51	0,76	0,54	0,10	13,37	19,04	15,26	12,22	9,54	6,93
52	0,44	0,89	1,40	16,25	23,26	21,86	17,51	14,42	12,54
53	0,23	0,33	0,21	11,85	20,13	24,94	17,71	15,86	13,38
56	0,50	0,89	1,35	16,66	18,26	12,59	9,29	6,88	5,49
57	0,05	0,00	0,10	16,26	23,95	17,79			
58	0,34	0,92	0,40	8,20	16,72	13,23	11,19		
59	3,02	2,96	3,41	8,31	15,39	16,24	12,88	11,63	10,45
60	0,35	0,32	0,76	9,18	11,69	8,53	6,53	5,72	5,32
61	3,36	3,55	4,12	7,81	10,60	10,93	9,19	9,11	8,71
62	3,10	2,81	3,54	22,31	28,45	21,28	9,67	7,28	6,84
63	0,97	1,45	1,66	16,07	27,17	20,22	16,08	10,19	8,05
64	3,27	3,75	2,33	16,33	26,32	17,70	12,39	8,07	7,16
65	3,87	3,01	4,25	6,09	8,39	13,30	10,16	9,28	9,61
66	4,23	2,84	2,68	24,68	35,44	28,48	16,90	12,54	11,15
69	0,83	1,08	0,59	8,41	10,69	7,79	4,30	3,78	3,93
71	-1,48	-1,32	-2,02	0,03	1,55	0,68	0,82	0,61	0,46
73	-0,28	0,66	0,65	1,47	9,97	8,43	5,20	5,86	5,51
83	3,13	2,63	2,90	15,22	14,68	20,57	14,16	13,44	9,70
N	22	22	22	22	22	22	21	20	19
$\bar{x}$	1,57	1,66	1,80	11,92	17,31	15,09	10,65	8,81	7,73
SD	1,540	1,355	1,598	5,928	7,819	6,449	4,612	3,400	3,370
SEM	0,329	0,289	0,341	1,264	1,667	1,375	1,007	0,893	0,766

Tab. 16: Glycogengehalt der Muskulatur in mg/g Feuchtgewicht, sofort nach Entnahme im M.triceps, M.quadriceps, nach 30-minütiger Ruheperfusion und nach weiteren 10 Minuten Muskelarbeit (mit 150 μ E/ml Insulin im Perfusionsmedium).

M.triceps						M.quadriceps		Ruheperfusion M.quadriceps		Arbeitsperfusion M.quadriceps	
3,82	3,29	2,62	5,57	3,32	3,53	5,80	4,00	4,70	4,00		
5,33	3,40	3,31	5,84	3,54	3,34	3,40	4,30	2,80	2,80		
3,68	4,45	3,41	4,34	4,67	3,73	3,80	3,40	2,80	2,30		
2,92	3,39	3,10	3,34	4,24	3,70	5,40	5,80	3,10	2,80		
2,48	4,75	3,60	3,60	4,26	4,74	5,20	4,10	2,00	2,80		
2,35	4,17	2,78	3,58	5,07	4,16	3,70	4,10	4,90	3,10		
3,34	3,21	3,94	3,67	3,66	4,30	8,10	2,70	2,00	1,70		
2,90	2,49	4,02	3,61	2,92	4,39	3,70	4,70	1,30	2,70		
3,98	5,30	3,90	4,56	4,45	3,98	4,10	3,70	4,50	4,30		
2,54	3,81	3,56	3,20	3,93	4,11	6,30	4,70	3,50	3,20		
3,53	3,54	2,40	3,84	3,80	3,53	5,20	5,60				
4,60	5,50	4,44	6,04	6,26	5,19	6,30	5,90				
4,19			5,14			5,20	5,50				
			4,80	6,90	4,40						
			3,80	2,70	3,40						
			4,60	4,10	4,00						
			5,10	5,60	3,30						
			4,20	4,50	5,00						
			4,80	5,10	4,00						
			3,70	2,70	3,60						
			4,20	5,70	5,60						
			5,00	4,20	4,50						
			6,00	5,00	5,40						
			4,20	4,40	7,00						
			5,19	6,73	4,75						
			4,94	5,54	5,86						
			3,48	3,42	2,86						
			2,60	2,74	7,35						
			5,43	4,40	5,45						
			3,88	4,27							
N	37		87			26		20			
$\bar{x}$	3,66		4,43			4,79		3,06			
SD	0,825		1,027			1,199		1,001			
SEM	0,136		0,110			0,23		0,22			

3.1.4. Fettstoffwechsel

Freie Fettsäuren und Glycerin entstehen durch intracelluläre Hydrolyse der gespeicherten Triglyceride. Durch eine hormonsensitive und eine nicht weiter aktivierbare Lipase wird diese Hydrolyse in Gang gesetzt.

Triglycerid	Diglycerid	Monoglycerid
	+	+
	NFS	NFS
aktive Lipase (hormonsensitiv)	3'-5'-AMP	nicht aktivierbare Lipase
inaktive Lipase (hormonsensitiv)		
		Glycerin
		+
		NFS

Das Ausmaß der Lipolyse läßt sich nur durch Bestimmung des Glycerins erfassen, da die Muskulatur über keine Glycerokinase verfügt und somit freies Glycerin aus der Zelle in die Blutbahn abgegeben wird (56). Gemessen am Glycerin fanden wir unter Ruhebedingungen ohne Insulinzusatz die Lipolyse konstant bei $0,274 \pm 0,011 \mu\text{mol/min/30 g Gewebe}$. Hier konnte über die gesamte Dauer der Ruheperfusion keine Änderung erfaßt werden; die Daten decken sich gut mit den Ergebnissen von RUDERMAN et al. (94). Unter Zusatz von $150 \mu\text{E/ml}$ Insulin zum Perfusionsmedium fand sich nach den ersten 15 Minuten eine signifikante Hemmung der Lipolyse auf $0,211 \pm 0,051 \mu\text{mol/min/30 g Gewebe}$ (freigesetztes Glycerin), was auf die antilipolytische Wirkung des Insulins zurückzuführen ist.

Die gleichzeitige Aufnahme an NFS betrug $0,688 \pm 0,038 \mu\text{mol/min/30 g Gewebe}$ bzw. $0,716 \pm 0,053 \mu\text{mol/min/30 g Gewebe}$ (mit Insulin); in beiden Fällen stellte sich der Verlauf über die Ruheperfusion in etwa konstant dar. Die große Schwankungsbreite in der Ruheperfusion wird aus der Überlagerung von zwei Effekten verständlich: die arterielle Extraktion NFS und die stets gleichzeitige Freisetzung von NFS durch die stets ablaufende Basislipolyse.

Während der Muskularbeit fanden wir mit $0,543 \pm 0,052 \mu\text{mol}/\text{min}/30 \text{ g}$ Gewebe (ohne Insulin) bzw. $0,498 \pm 0,061 \mu\text{mol}/\text{min}/30 \text{ g}$ Gewebe eine deutlich verminderte NFS-Aufnahme gegenüber den entsprechenden Ruhewerten (Tabelle 25 und Tabelle 26). Da eine Mehraufnahme von NFS unter Muskularbeit mittels markierter NFS mehrfach gezeigt werden konnte (19, 20, 21, 59), müssen wir annehmen, daß wir falsch niedrige Aufnahmeraten zur Zeit der Muskularbeit messen. Hierfür kommen mehrere Faktoren in Frage:

1. Überlagerung der arteriellen Extraktion und gleichzeitige NFS-Freisetzung durch die ablaufende Lipolyse in den venösen Schenkel; die Untersuchungen sind ohne markierte Substanzen durchgeführt.
2. Dem Perfusionsmedium wurden keine zusätzlichen NFS zugesetzt; die vorhandenen NFS (an Albumin gebunden) sind aber unterschiedlich mobilisierbar und folglich für Stoffwechselprozesse nur bedingt zugänglich.
3. Aus Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen (43) ist bekannt, daß die Aufnahme verschieden-langkettiger NFS in die Muskulatur unterschiedlich ist; ebenso folgt die Aufnahme der NFS mit steigendem arteriellem Angebot nicht immer einer Linearen. Da wir die Einzelzusammensetzung der von uns verwendeten NFS nicht kennen (siehe 2.2.2.), könnten die zu niedrig gefundenen NFS-Aufnahmeraten durch unterschiedliches Verhalten verschieden langkettiger NFS erklärt werden.
4. Kombination der vorher ausgeführten Ursachen.

Da der mögliche Fehler der sicher zu niedrigen NFS-Aufnahme nicht zu eliminieren ist, schliessen wir die NFS in den weiteren Überlegungen aus.

Aus Untersuchungen am Menschen (19, 20, 62, 109) und am Ganztier weiß man, daß unter langdauernder Muskularbeit das freie Glycerin als Ausdruck der ablaufenden Lipolyse ansteigt. An der isoliert perfundierten Muskulatur fanden wir bei kurzfristiger Muskularbeit keine weitere Steigerung der Glycerinfreisetzung; im Gegenteil, es fand sich ein signifikanter Abfall der Glycerinfreisetzung auf $0,205 \pm 0,011 \mu\text{mol}/\text{min}/30 \text{ g}$ Gewebe (Tabelle 25) (ohne Insulin) bzw. auf $0,184 \pm 0,032 \mu\text{mol}/\text{min}/30 \text{ g}$ Gewebe (Tabelle 26). Da bei der Triglycerid-Hydrolyse nicht prinzipiell alle drei an das Glycerin veresterten Fettsäuren abgespalten werden müssen, aber nur freies Glycerin die Zelle verlassen kann, schließt dieser von

uns erhobene Befund eine Fettspaltung nicht aus; eine wesentliche Triglycerid-Hydrolyse scheint aber unter den von uns gewählten Bedingungen nicht vorzuliegen.

Da von anderen Arbeitsgruppen (9, 42, 94) am gleichen Untersuchungsmodell die Ergebnisse meist zu 15 Minuten-Perioden zusammengefaßt sind, wurden hier, um bessere Vergleiche ziehen zu können, die Ergebnisse der Ruheperfusion in drei 15-Minuten-Perioden, die Ergebnisse der Arbeitsperfusion in eine 15-Minuten-Ruheperfusion, 10-minütige Arbeitsphase und je zwei jeweils 10-minütige Erholungsphasen zusammengefaßt (siehe Tabelle 23, 24, 25, 26 und Abbildung 12 und 13).

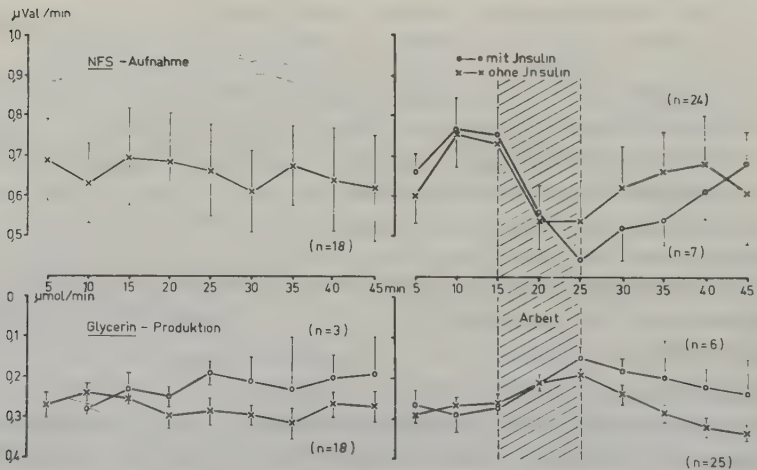


Abb. 11: Vergleich Ruhe- und Arbeitsperfusion. NFS-Aufnahme und Glycerinfreisetzung in $\mu\text{mol}/\text{min}/30$ g Gewebe mit Insulin O---O und ohne X---X Insulin im Perfusionsmedium.

Tab. 17: NFS-Aufnahme in $\mu\text{mol}/\text{min}/30 \text{ g}$ Gewebe während 45-minütiger Ruheperfusion mit 150 $\mu\text{E}/\text{ml}$ Insulin (oben) und ohne Insulinzusatz zum Perfusionsmedium.

Ratte Nr.	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇	R ₈	R ₉
42	0,960	1,184	1,064	0,592	1,344	1,632			
81	0,144	0,229	0,477	0,457	0,568	0,459	0,421	0,749	0,658
	0,552	0,707	0,771	0,525	0,956	1,046	0,421	0,749	0,658
Ratte Nr.	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇	R ₈	R ₉
68	0,210	0,288	0,360	0,453	0,199	0,251	0,328	0,310	0,296
70	1,704		2,192	1,986	1,584	1,584	1,656	1,807	1,594
72	0,580	0,757	0,572	0,602	0,535	0,548	0,544	0,529	0,464
74	0,661	0,752	0,935	0,774	0,915	0,866	0,659	0,685	0,463
75	0,781	0,789	0,767	0,694	0,732	0,637	0,656		
76	0,365	0,280	0,309	0,037	0,136	0,038	0,056	0,129	0,189
77	1,111	1,111	1,018	1,033	0,839	0,812	0,828	1,057	0,918
78	0,140	0,027	0,108	0,399	0,277	0,235			
79	1,397	1,359	1,327	1,266	0,987	0,965	0,956		
86	0,268	0,199	0,255	0,126	0,021	0,080	0,101	0,079	0,054
87	0,763	0,424	0,538	0,589	0,430	0,259	0,458	0,364	0,458
88	0,313	0,402	0,444	0,393	0,666	0,271	0,408	0,421	
89	0,574	0,551	0,678	0,605	0,721	0,678	0,605	0,448	0,698
90	0,519	0,268	0,214	0,261	0,203	0,403	0,289	0,337	0,253
91	0,191	0,030	0,403	0,477					
92	1,051	1,263							
93	0,479	0,816	0,583	0,469	0,952	1,190	1,360	0,987	0,901
94	1,390	1,414	1,156	1,526	1,465	1,001	1,219	1,252	1,238
N	18	17	17	17	16	16	15	13	12
$\bar{x}$	0,694	0,631	0,698	0,688	0,666	0,614	0,675	0,647	0,627
SD	0,463	0,451	0,515	0,507	0,456	0,435	0,459	0,498	0,460
SEM	0,109	0,109	0,125	0,123	0,114	0,109	0,119	0,138	0,133

Tab. 18: NFS-Aufnahme während Ruhe, 10-minütiger Arbeitsphase und in der Erholungsphase ohne Insulinzusatz zum Perfusionsmedium.

Ratte Nr.	R ₁	R ₂	R ₃	A ₁	A ₂	E ₁	E ₂	E ₃	E ₄
16	0,725	1,461	1,281	0,943	0,828	0,875	0,703	0,979	0,851
18	0,196	0,396	0,364	0,084	0,184	0,055	0,308	0,246	0,312
40	1,047	1,317	1,346	1,662	1,797	1,137	1,430	2,083	
46	0,709	0,257	0,382	0,396	0,476	0,911	0,372	0,372	
48	0,198	0,360	0,560	0,117	0,166	0,297	0,248	0,399	0,546
51	1,061	1,061	1,081	0,977	0,857	0,933	0,992	0,559	0,447
56	0,308	0,612	0,699	0,681	0,460	0,523	0,149	0,545	0,491
57	0,305	0,268	0,388	0,297	0,320	0,286			
58	0,439	0,514	0,629	0,537	0,217	0,334	0,316		
59	0,396	0,270	0,131	0,198	0,343	0,194	0,250	0,204	0,216
60	0,780	0,900	0,937	0,601	0,664	0,679	0,732	0,725	0,606
61	0,163	0,285	0,449	0,530	0,565	0,367	0,277	0,122	0,100
62	-0,136	0,381	0,532	0,281	0,448	0,777	0,684	0,868	0,595
63	1,117	0,672	0,874	0,453	0,463	0,712	0,824	0,488	0,919
64	0,585	0,836	0,623	0,172	0,446	0,374	0,744	0,653	0,266
65	0,684	0,799	0,844	0,243	0,390	0,620	0,726	0,704	0,844
66	0,578	0,564	0,816	0,380	0,686	0,658	0,822	0,727	0,836
67	0,136	1,117	1,065	0,892	0,733	1,299	1,326	1,056	0,148
69	1,152	1,472	1,139	1,182	0,876	1,136	1,103	0,838	0,933
71	1,152	1,298	1,147	0,626	0,748	0,728	0,583	0,816	0,734
73	1,232	1,292	1,077	0,522	0,441	0,794	1,171	1,303	
80	0,781	0,766	0,603	0,412	0,411	0,362	0,565		0,397
82	0,285	0,555	0,628	0,638	0,427	0,508	0,554	0,487	0,544
83	0,539	0,612	0,118	0,183	0,083	0,421	0,381	0,180	0,205
N	24	24	24	24	24	24	23	21	20
$\bar{x}$	0,601	0,753	0,738	0,542	0,543	0,624	0,663	0,683	0,610
SD	0,385	0,402	0,349	0,375	0,346	0,321	0,360	0,442	0,320
SEM	0,079	0,082	0,071	0,077	0,071	0,066	0,075	0,096	0,071

Tab. 19: Glycerinfreisetzung in $\mu\text{mol}/\text{min}/30 \text{ g}$ Gewebe während 45-minütiger Ruheperfusion mit $150 \mu\text{E}/\text{ml}$ Insulin (oben) und ohne Insulin-Zusatz zum Perfusionsmedium.

Ratte Nr.	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇	R ₈	R ₉
41		0,196	0,145	0,123	0,134	0,137	0,086	0,120	0,076
43		0,347	0,291	0,411	0,252	0,352	0,500	0,325	0,393
81	0,351	0,299	0,275	0,235	0,202	0,163	0,115	0,163	0,121
N	1	3	3	3	3	3	3	3	3
$\bar{x}$	0,351	0,281	0,237	0,256	0,196	0,217	0,234	0,203	0,197
SD		0,077	0,079	0,145	0,089	0,117	0,231	0,108	0,171
SEM		0,045	0,046	0,084	0,034	0,068	0,133	0,062	0,099

Ratte Nr.	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇	R ₈	R ₉
68	0,322	0,288	0,270	0,248	0,218	0,133	0,256	0,211	0,255
70	0,450		0,442	0,412	0,389	0,460	0,496	0,412	0,374
72	0,232	0,121	0,124	0,185	0,191	0,155	0,148	0,146	0,144
74	0,242	0,227	0,272	0,224	0,240	0,274	0,181	0,266	0,263
75	0,222	0,223	0,220	0,171	0,185	0,186			
76	0,171	0,128	0,140	0,092	0,065	0,053	0,048	0,081	0,069
77	0,141	0,141	0,115	0,095	0,153	0,126	0,131	0,130	0,153
78	0,129	0,219	0,165	0,207	0,170	0,177	0,187		
79	0,312	0,350	0,326	0,337	0,414	0,425	0,421		
85	0,337	0,404	0,382	0,405	0,374	0,370	0,366	0,390	0,399
86	0,243	0,232	0,232	0,375	0,361	0,328	0,413	0,379	0,335
87	0,129	0,105	0,070	0,079	0,149	0,067	0,070	0,070	0,079
88	0,304	0,243	0,273	0,279	0,288	0,306	0,308	0,316	0,386
89	0,118	0,156	0,152	0,178	0,185	0,194	0,215	0,219	0,221
90	0,197	0,187	0,222	0,225	0,208	0,182	0,206	0,191	0,207
91	0,173	0,166	0,183	0,213					
92	0,459	0,451							
93	0,607	0,464	0,586	0,603	0,339	0,571	0,633	0,323	0,288
94	0,354	0,372	0,542	0,921	0,972	0,987	1,000	0,621	0,703
N	19	18	18	18	17	17	17	14	14
$\bar{x}$	0,271	0,249	0,262	0,292	0,287	0,294	0,310	0,268	0,277
SD	0,131	0,114	0,145	0,205	0,202	0,229	0,236	0,151	0,163
SEM	0,030	0,027	0,034	0,048	0,049	0,056	0,057	0,040	0,043

Tab. 20: Glycerinfreisetzung in $\mu\text{mol}/\text{min}/30 \text{ g}$ Gewebe während Ruhe, 10-minütiger Arbeit und in der Erholungsphase ohne Insulinzusatz zum Perfusionsmedium.

Ratte Nr.	R ₁	R ₂	R ₃	A ₁	A ₂	E ₁	E ₂	E ₃	E ₄
40	0,288	0,183	0,193	0,272	0,158	0,227	0,298	0,364	
45	0,221	0,228	0,191	0,221	0,201	0,199	0,134	0,092	0,084
46		0,450	0,426	0,290	0,247	0,263	0,290	0,292	0,322
48	0,263	0,258	0,263	0,358	0,268	0,256	0,300	0,368	0,442
51	0,350	0,343	0,323	0,313	0,217	0,235	0,251	0,239	0,177
52	0,270	0,264	0,219	0,169	0,134	0,173	0,213	0,297	0,198
53	0,261	0,252	0,339	0,174	0,141	0,201	0,264	0,295	0,33
56	0,243	0,261	0,227	0,250	0,130	0,146	0,162	0,223	0,24
57	0,156	0,145	0,163	0,129	0,125	0,121			
58	0,199	0,187	0,185	0,156	0,159	0,140	0,141		
59	0,230	0,207	0,223	0,275	0,231	0,236	0,277	0,320	0,31
60	0,348	0,240	0,183	0,126	0,142	0,208	0,219	0,341	0,3
61	0,166	0,181	0,176	0,236	0,252	0,199	0,185	0,216	0,24
62	0,338	0,399	0,320	0,162	0,165	0,172	0,182	0,192	0,17
63	0,463	0,449	0,361	0,353	0,307	0,424	0,584	0,628	0,56
64	0,482	0,509	0,467	0,342	0,237	0,223	0,342	0,418	0,36
65	0,450	0,306	0,272	0,096	0,171	0,428	0,600	0,563	0,6
66	0,425	0,418	0,336	0,184	0,241	0,392	0,309	0,455	0,5
67	0,504	0,505	0,403	0,285	0,233	0,448	0,528	0,483	0,7
69	0,375	0,359	0,239	0,216	0,249	0,348	0,399	0,390	0,3
71	0,203	0,163	0,134	0,122	0,151	0,155	0,151	0,159	0,1
73	0,387	0,310	0,385	0,358	0,330	0,358	0,248	0,201	0,3
80	0,128	0,146	0,141	0,101	0,108	0,115	0,215	0,249	0,3
82	0,196	0,184	0,243	0,189	0,144	0,132	0,247	0,293	0,28
83	0,135	0,012	0,097	0,075	0,055	0,151	0,230	0,159	0,15
N	24	25	25	25	25	25	24	23	22
$\bar{x}$	0,295	0,279	0,260	0,218	0,192	0,238	0,282	0,315	0,32
SD	0,114	0,125	0,098	0,088	0,066	0,102	0,129	0,132	0,15
SEM	0,023	0,025	0,020	0,018	0,013	0,020	0,026	0,028	0,03

Tab. 21: Glycerinfreisetzung in $\mu\text{mol}/\text{min}/30 \text{ g}$ Gewebe während Ruhe, 10-minütiger Arbeit und in der Erholungsphase mit Insulin-zusatz ($150 \mu\text{E}/\text{ml}$) zum Perfusionsmedium.

Ratte Nr.	R ₁	R ₂	R ₃	A ₁	A ₂	E ₁	E ₂	E ₃	E ₄
13	0,139	0,142	0,120	0,137	0,104	0,094	0,095	0,139	0,139
47	0,155	0,177	0,147	0,065	0,085	0,102			
49	0,313	0,319	0,266	0,175	0,155	0,177	0,177	0,196	0,169
50	0,236	0,240	0,169	0,151	0,054	0,117	0,148	0,176	
54	0,384	0,410	0,430	0,346	0,265	0,251	0,369	0,386	0,398
55	0,393	0,487	0,524	0,404	0,262	0,322			
N	6	6	6	6	6	6	4	4	3
$\bar{x}$	0,270	0,296	0,276	0,213	0,154	0,177	0,197	0,224	0,235
SD	0,111	0,135	0,165	0,132	0,091	0,092	0,119	0,110	0,141
SEM	0,045	0,055	0,068	0,054	0,039	0,038	0,090	0,055	0,082

Tab. 22: NFS-Aufnahme in $\mu\text{mol}/\text{min}/30 \text{ g}$ Gewebe während Ruhe, 10-minütiger Arbeit und in der Erholungsphase mit Insulin-zusatz ($150 \mu\text{E}/\text{ml}$) zum Perfusionsmedium.

Ratte Nr.	R ₁	R ₂	R ₃	A ₁	A ₂	E ₁	E ₂	E ₃	E ₄
13	0,555	0,429	0,848	0,557	0,866	1,043	0,910	0,606	0,606
47		0,837	0,870	0,589	0,510	0,320	0,630		
49	0,751	0,824	0,674	0,377	0,335	0,423	0,259	0,303	0,360
50	0,595	0,666	0,480	0,398	0,074	0,276	0,375	0,375	
53			0,524	0,417	0,161	0,173	0,346	0,892	0,927
54	0,612	0,819	0,779	0,842	0,608	0,697	0,727	0,921	0,827
55	0,790	0,992	1,073	0,695	0,543	0,713			
N	5	6	7	7	7	7	6	5	4
$\bar{x}$	0,661	0,761	0,750	0,553	0,442	0,521	0,541	0,619	0,680
SD	0,103	0,177	0,208	0,172	0,273	0,309	0,254	0,285	0,252
SEM	0,046	0,072	0,073	0,065	0,103	0,117	0,104	0,128	0,126

Tab. 23: Substratumsatz in $\mu\text{mol}/\text{min}/30 \text{ g Gewebe}$ ($\bar{x} \pm \text{SEM}$)
während 45-minütiger Ruheperfusion ohne Insulin-
zusatz zum Perfusionsmedium;
++ 2p 0,01 (gegenüber der ersten 15-Minuten-
Periode).

	0-15 Min.	15-30 Min.	30-45 Min.
Glucose	$1,66 \pm 0,19$ (87)	$1,88 \pm 0,31$ (33)	$2,81 \pm 0,41^{++}$ (25)
Lactat	$1,68 \pm 0,13$ (101)	$2,12 \pm 0,18$ (31)	$2,29 \pm 0,26^{++}$ (22)
NFS	$0,688 \pm 0,038$ (124)	$0,657 \pm 0,066$ (49)	$0,651 \pm 0,073$ (40)
Glycerin	$0,274 \pm 0,011$ (129)	$0,293 \pm 0,029$ (51)	$0,287 \pm 0,028$ (45)

Tab. 24: Substratumsatz in $\mu\text{mol}/\text{min}/30 \text{ g Gewebe}$ ($\bar{x} \pm \text{SEM}$)
während 45-minütiger Ruheperfusion mit 150 $\mu\text{E}/\text{ml}$
Insulin im Perfusionsmedium;
xx p 0,05

	0-15 Min.	15-30 Min.	30-45 Min.
Glucose	$4,26 \pm 0,30$ (25)	$4,84 \pm 0,34$ (9)	$5,40 \pm 0,46^{xx}$ (9)
Lactat	$1,96 \pm 0,29$ (25)	$1,81 \pm 0,40$ (6)	$2,45 \pm 0,43$ (5)
NFS	$0,716 \pm 0,053$ (24)	$0,842 \pm 0,209$ (6)	$0,609 \pm 0,098$ (3)
Glycerin	$0,278 \pm 0,023$ (25)	$0,223 \pm 0,034$ (9)	$0,211 \pm 0,051$ (9)

Tab. 25: Substratumsatz in $\mu\text{mol}/\text{min}/30$ g Gewebe während Ruhe, 10-minütiger Arbeit und in der Erholungsphase ohne Insulinzusatz zum Perfusionsmedium; angegeben sind:

Mittelwert $\bar{x} \pm \text{SEM}$; in Klammern die Zahl der Versuche;
 $\S\S$ 2p 0,001
 $\&\&$ 2p 0,005
 xx 2p 0,05

Ruhe	Arbeit	Erholung 0 - 10	Erholung 10 - 20
Glucose			
$1,66 \pm 0,19$ (87)	$3,02 \pm 0,32^{\S\S}$ (34)	$4,56 \pm 0,36^{\&\&}$ (33)	$4,88 \pm 0,37$ (30)
Lactat			
$1,68 \pm 0,13$ (101)	$14,33 \pm 1,15^{\S\S}$ (44)	$12,92 \pm 0,92$ (43)	$8,28 \pm 0,59^{\S\S}$ (39)
NFS			
$0,688 \pm 0,038$ (124)	$0,542 \pm 0,052^{xx}$ (48)	$0,643 \pm 0,049$ (47)	$0,647 \pm 0,060$ (41)
Glycerin			
$0,274 \pm 0,011$ (129)	$0,205 \pm 0,011^{\S\S}$ (50)	$0,260 \pm 0,017^{\&\&}$ (49)	$0,322 \pm 0,021^{xx}$ (45)

Tab. 26: Substratumsatz in $\mu\text{mol}/\text{min}/30 \text{ g}$ Gewebe ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) während Ruhe, 10-minütiger Arbeit und in der Erholungsphase mit Insulinzusatz ($150 \mu\text{E}/\text{ml}$) zum Perfusionsmedium;

++ 2p 0,025
 xx 2p 0,05
 §§ 2p 0,001

	Ruhe	Arbeit	Erholung 0 - 10	Erholung 10 - 20
Glucose	$4,26 \pm 0,30$ (25)	$5,62 \pm 0,51^{++}$ (12)	$6,91 \pm 0,64$ (10)	$6,89 \pm 0,67$ (7)
Lactat	$1,96 \pm 0,29$ (25)	$13,59 \pm 1,52^{§§}$ (12)	$13,41 \pm 1,77$ (10)	$7,47 \pm 1,20^{xx}$ (7)
NFS	$0,716 \pm 0,053$ (24)	$0,498 \pm 0,061^{++}$ (14)	$0,530 \pm 0,076$ (13)	$0,646 \pm 0,085$ (9)
Glycerin	$0,278 \pm 0,023$ (25)	$0,184 \pm 0,032^{++}$ (12)	$0,185 \pm 0,031$ (10)	$0,229 \pm 0,043$ (7)

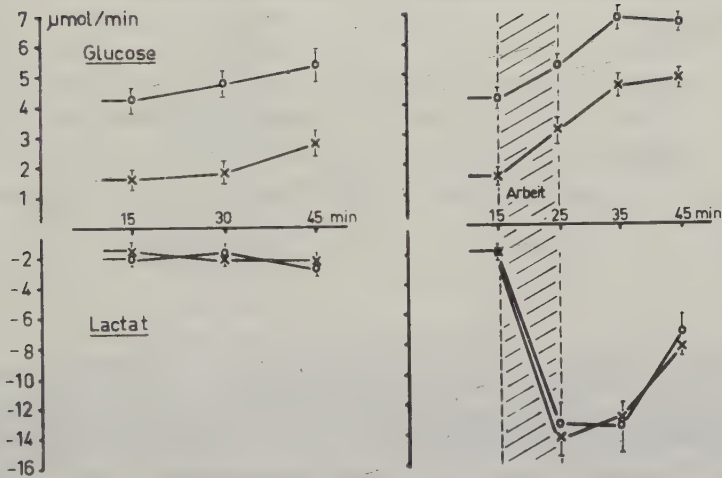
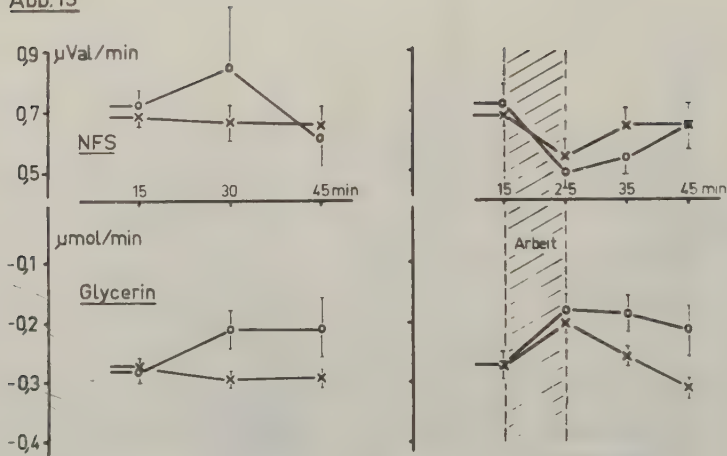


Abb. 12: Glucoseaufnahme und Lactatproduktion in $\mu\text{mol/min}/30\text{ g}$ Gewebe ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) mit Insulin O---O und ohne Insulin X---X im Perfusionsmedium. Bei der Ruheperfusion wurden die Ergebnisse in 15-Minuten-Perioden zusammengefaßt; bei der Arbeitsperfusion wurde der 15-Minuten-Ruheperiode die Arbeitsperiode (10 Minuten) und zwei Erholungsphasen (je 10 Minuten) gegenübergestellt.

Abb.13



NFS-Aufnahme und Glycerinabgabe in $\mu\text{mol}/\text{min}/30 \text{ g}$ Gewebe ($\bar{x} + \text{SEM}$) mit Insulin $\circ-\circ$ und ohne Insulin $x-x$ im Perfusionsmedium; bei der Ruheperfusion wurden die Ergebnisse in 15-Minuten-Perioden zusammengefaßt. Bei der Arbeitsperfusion wurde der 15-Minuten-Ruheperiode die Arbeitsperiode (10 Min.) und zwei Erholungsphasen (je 10 Min.) gegenübergestellt.

4. UNTERSUCHUNGEN ZUR AUFNAHMEKINETIK VON
SCHILDDRÜSENHORMONEN UND CORTICOSTERON

4.1. Bestimmungsmethoden der verwendeten Hormone

4.1.1. Corticosteron, fluorimetrische Bestimmung

Die Corticosteronbestimmung erfolgte nach der von SPENCER-PEET (101) angegebenen fluorimetrischen Methode zur Cortisolbestimmung, die von A.GERB (40) und W.PISTER (83) zur routinemässigen Bestimmung von Corticosteron im Rattenserum modifiziert worden war. Die Messungen wurden an einem Beckmann-Fluorimeter ausgeführt (Absorptionsmaximum 522 nm, Emissionsmaximum 464 nm); es wurde eine von A.GERB (40) entwickelte Absaugküvette verwendet. Das Fluoreszenzreagens (350 ml H_2SO_4 konz. in 150 ml Äthanol abs.) wurde vor jedem Versuchsdurchgang neu hergestellt.

Folgende Corticosteronstandards wurden verwendet:

0,05 µg/ml

0,03 µg/ml

0,01 µg/ml

Leerwert 1 ml Aqua dest.

Alle Proben und das bei jedem Durchgang mitlaufende Kontrollserum wurden 1:9 mit Aqua dest. verdünnt.

Mit dieser Methode war bei den von uns verwendeten Konzentrationen (ca. 35 µg%) eine Genauigkeit von VK = 8,6% zu erzielen.

4.1.2. Qualitative radiologische Messung
von $18-28-^3H$ -Corticosteron

Dem Standardperfusionsmedium waren 10 ml der $18-28-^3H$ -Corticosteron-Stammlösung (siehe 2.2.4.6.) zugesetzt worden. Proben von 1 ml Serum wurden mit 10 ml Szintillationsgemisch versetzt, ca. 30 sec lang geschüttelt und dann in einem "Tri-Crab-Liquid Scintillation-Spectrometer" (Modell 3324, Packard-Instrument-Company, Illinois, USA) 1 min lang gezählt.

Der statistische Fehler der Zählung errechnet sich aus folgender Gleichung:

$$\frac{1}{N} \times 100 = \text{stat.Fehler in \%}; N = \text{Anzahl der insgesamt gezählten Impulse}$$

Unsere Proben ergaben eine Impulsrate von ca. 5000 cpm, so daß der statistische Fehler bei ca. 1,5% lag.
Bei der Bestimmung der arterio-venösen Differenzen war ein Quencheffekt nicht zu berücksichtigen, da der Korrekturfaktor immer 0,99 bzw. 1,0 betrug.

4.1.3. Bestimmung des L-Thyroxin

Die Messung des Gesamtthyroxin beruhte auf der von MURPHY und PATTEE angegebenen Methode der kompetitiven Proteinbindungsanalyse, modifiziert nach HORN et al. (47).

Hierbei wird eine T_4 -Tracer-Lösung und Serumproben auf alkalisierte Sephadex-Säulen gepumpt. T_4 wird quantitativ aus dem Serum extrahiert, adsorbiert und nach Umpufferung auf der gleichen Säule wird das T_4 an das anschließend auf die Säule gepumpte TBG gebunden. Der proteingebundene Anteil des $^{125}\text{J}-T_4$ wird mit Barbitol-Puffer eluiert, direkt in Reagenzröhrchen gesammelt und die jeweilige Radioaktivität ohne weiteren Pipettiervorgang direkt am Gamma-Meßplatz gemessen (Gamma-Guard, Fa. Tracerlab S.A., Köln). Die Auswertung erfolgte automatisch mit Hilfe des Spline-Approximationsverfahrens.

4.1.4. Qualitative Messung von T_4 bzw. T_3

Die unter 2.2.4.5. beschriebene Stammlösung wurde dem Perfusionsmedium als "Tracer" zugesetzt. Dieses Verfahren ermöglichte es uns, direkt Proben der arteriellen und venösen Fraktionen am Gamma-Meßplatz zu messen. Die gezählten counts der venösen Proben pro Zeiteinheit wurden in Prozent zu den arteriellen counts umgerechnet, und es ließen sich somit qualitative Aussagen über die aufgenommene Menge Schilddrüsenhormon pro Zeiteinheit machen.

4.2. Homogenisation und Differentialzentrifugation von Muskeln

4.2.1. Vorbemerkung

Unser Ziel war die Trennung und Gewinnung von 3 Zellfraktionen: Kernfraktion, Mitochondrialfraktion und Mikrosomenfraktion zusammen mit der löslichen Zellfraktion. Dabei war für uns wichtig, die

einzelnen Fraktionen quantitativ möglichst vollständig zu erhalten. Deswegen wählten wir von den zur Verfügung stehenden Möglichkeiten der Zellhomogenisation die der Homogenisation im wässerigen Milieu mit anschließender Differentialzentrifugation (8, 45, 99).

4.2.2. Muskelextraktion

Unmittelbar anschließend an die Perfusion wurde 5 min lang die Hinterbeinmuskulatur mit physiologischer Kochsalzlösung perfundiert, um das Gefäßsystem der Muskulatur so gut wie möglich von Perfusionsmedium zu reinigen, da an Erythrocyten gebundenes radioaktives Hormon störend auf die spätere Bestimmung eingegangen wäre. Dann präparierten wir die gesamte perfundierte Muskulatur von Knochen, Bindegewebe und sichtbarem Fett frei und froren sie sofort zur späteren Aufbereitung ein.

4.2.3. Homogenisation

Muskelstücke zwischen 5 - 8 g wurden 3 x 3 sec lang mit einem Homogenisator ("Ultra-Turrax", Fa. Joh.Gg.Bachhofer) in 2 ml isotonem Suspensionsmedium homogenisiert. Das Homogenat wurde durch einen Gaze-Streifen gefiltert, um die verbliebenen Bindegewebsfasern abzutrennen. Das Suspensionsmedium hatte folgende Zusammensetzung (8) :

0,25 M Saccarose
0,08 M KCl
0,01 M $MgCl_2$
0,05 M Tris-Puffer pH 7,1.

Das gemessene pH des Gemisches lag bei 7,41

Das Homogenat schütteten wir in 10 ml-Zentrifugengläser und gaben 8 ml Suspensionsmedium zu. Dann zentrifugierten wir 15 min lang in einer Hettich Rotor Silenta II-Zentrifuge bei 1000 x g. Der Überstand wurde abgegossen. Das Sediment bestand lichtmikroskopisch aus Zellkernen, z.T. mit einem Cytoplasmasaum umgeben. Vereinzelt sah man auch kleine Muskelfaserstücke.

Der Überstand der ersten Fraktion wurde bei 15 000 x g (Martin Christ Junior 15 000) 20 min lang zentrifugiert. Es bildete sich ein fest verbackenes Sediment, welches hauptsächlich aus Mitochondrien, z.T. jedoch auch aus Zellkernbruchstücken bestand. Bei den gewonnenen Fraktionen handelt es sich nicht um reine Kern- bzw. Mitochondrienfraktionen (45); mit Hilfe dieser weiteren Aufarbeitung des Zellmaterials konnte aber gezeigt werden, daß die durch die a-v-Differenz-Messung gefundene Verschwinderate der markierten Hormone einer echten Bindung an intrazelluläre Strukturen entspricht.

4.2.4. Gewebsauflösung und Flüssigkeitszintillationszählung

Die Kern- und die Mitochondrialfraktion wurde je in 1 ml Tissue Solubiliser TS-1 (Koch-Light Laboratories Ltd. 0,6 M) versetzt, geschüttelt und 24 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Nach dieser Zeit waren beide Fraktionen vollständig gelöst. Die gallertige Masse löste sich leicht in 10 ml Szintillationsgemisch (Fa. Packard) und konnte so im β -Zähler (Packard) gezählt werden.

Das Problem bei der Messung von Isotopen im biologischen Material liegt darin, daß die Zählausbeute abhängig ist von Wassergehalt, Farbe etc. des Mediums (70). Da die Zusammensetzung der einzelnen Fraktionen unterschiedlich war, mußte eine "Quenchkorrektur" durchgeführt werden (70). Jede einzelne Probe wurde zusammen mit im Szintillationszähler fest eingebauten Standard (γ -Strahler) gezählt.

Wir setzten die Zählausbeute von Serum bzw. Überstand gleich 1 und berechneten dazu den Korrekturfaktor für die Kern- und Mitochondrialfraktion. Er betrug für die Kernfraktionen 0,70, für die Mitochondrialfraktionen 0,93.

4.3. Ergebnisse der Untersuchungen
mit Corticosteronzusatz

TOMKINS, BAXTER, SEKERIS und andere (6, 7, 72, 93, 96) haben in ihren Untersuchungen besonders an Hepatomzellen und auch an Uteruszellen zeigen können, daß Steroidhormone - insbesondere untersucht wurden Glucocorticoide (Corticosteron, Dexamethason) und Progesteron - sehr schnell permeieren und an cytoplasmatische Rezeptorproteine gebunden werden. Diese, durch die Bindung an Steroidhormone sterisch veränderten Rezeptoren werden ihrerseits an Acceptoren gebunden, die dann die nukleäre DNA und über den RNA-Mechanismus die Synthese von Enzymen induzieren (Enzyminduktion) (57).

An Hand unseres Modells untersuchten wir die Aufnahmekinetik der Steroidhormone (Corticosteron) unter Ruhebedingungen und bei Muskularbeit:

1. durch fluorimetrische Messung der arterio-venösen Differenzen des Corticosteron unter Berücksichtigung der Durchblutungsrate,
2. durch bilanzmäßige Erfassung der Verschwinderate von markiertem Corticosteron und gleichzeitigem Nachweis der Bindung an intrazelluläre Strukturen.

4.3.1. Ergebnisse der fluorimetrischen Messungen

Der fluorimetrisch gemessene Corticosteronspiegel bei ungestreßten Ratten liegt bei ca. 25 µg% (70). Wir wählten eine höhere arterielle Corticosteronkonzentration, um eine Hormonaufnahme erwarten zu können. Sie lag, fluorimetrisch gemessen, bei $38,25 \pm 1,86$ µg% (n=10). Wir fanden - nach 15 min wash-out-period - während der Ruhephase eine langsame Abnahme der a-v-Differenz, die auch während der Arbeitsphase anhielt. Erst in der Erholungsphase stiegen die Werte wieder langsam an, um gegen Ende der Perfusion erneut abzufallen (Tab. 27, Abb. 14). Wir schließen daraus, daß im Anschluß an die Arbeit eine vermehrte Aufnahme von Corticosteron ins Gewebe stattfindet. Unter der Voraussetzung, daß Corticosteron durch die Zellmembran diffundiert und die Bindung an den Rezeptor

dem Massenwirkungsgesetz unterliegt, wäre theoretisch eine asymptotische Annäherung der venösen an die arteriellen Corticosteronkonzentrationen und damit eine asymptotische Annäherung der a-v-Differenzen gegen Null zu erwarten (46).

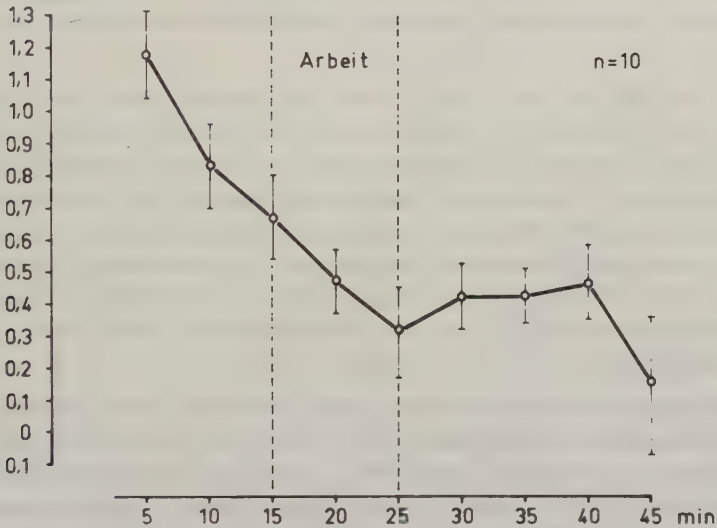
Da jedoch während und nach Arbeit die Durchblutungsrate bzw. die Anzahl der durchbluteten Kapillaren zunimmt (38, 64), können diese theoretischen Überlegungen, die sich auf steady state Bedingungen stützen, nicht auf unser Modell übertragen werden. Eine Mehrdurchblutung bewirkt offensichtlich auch eine Mehraufnahme von Steroidhormonen.

Tab. 27: Corticosteron-uptake. Konzentrationen fluorimetrisch bestimmt ($\mu\text{mol}/\text{min}/30 \text{ g}$ Gewebe, art.Konz. $38,25 \pm 1,86 \mu\text{g}\%$).

Ratte Nr.	R ₁	R ₂	R ₃	A ₁	A ₂	E ₁	E ₂	E ₃	E ₄
47	-	0,719	0,737	0,747	0,927	0,747	0,631	-	-
48	1,876	0,757	1,060	0,981	0,923	0,577	0,736	1,136	1,262
49	1,118	1,150	0,890	0,593	-0,272	-0,201	0,247	-0,013	-0,347
50	0,989	0,395	0,296	0,173	0,148	0,241	0,432	0,259	-
51	0,058	0,470	0,763	0,378	0,378	0,459	0,445	0,675	0,420
52	0,793	0,323	0,088	-0,020	0,324	0,069	-0,115	0,069	-0,208
53	1,440	1,470	1,057	0,742	0,612	-0,105	0,630	0,841	0,105
54	0,568	0,460	0,135	0,717	-0,347	0,115	0,321	0,321	-0,173
55	1,524	1,419	1,336	0,442	0,442	0,603	-	-	-
56	1,212	1,182	0,762	0,503	0,231	0,493	0,493	0,357	0,357
$\bar{x}$	1,064	0,834	0,712	0,525	0,336	0,299	0,424	0,455	0,202
SEM	$\pm 0,181$	$\pm 0,137$	$\pm 0,131$	$\pm 0,093$	$\pm 0,136$	$\pm 0,101$	$\pm 0,084$	$\pm 0,139$	$\pm 0,186$

Abb14 Corticosteron - uptake / 30g Muskel

$\mu\text{mol}/\text{min}$



4.3.2. Ergebnisse mit markiertem Corticosteron

In den Versuchen mit markiertem Corticosteron wurde dem Per-fusionsmedium zu den $38,25 \pm 1,86 \mu\text{g}\%$ kalten Corticosteron als "Tracer" 1β - 2β - ^3H -Corticosteron gegeben (siehe 4.1.2.). Die "counts" der arteriellen Fraktionen wurden gemittelt und gleich 100% gesetzt, da die arteriellen Corticosteronkonzentrationen, wie in Vorversuchen (Leerperfusionen) festgestellt, unverändert geblieben waren. Die counts der venösen Fraktionen wurden in Prozent davon ausgerechnet:

$$\text{venöse cpm}\% = \frac{\text{ven.cpm} \times 100}{\text{art.cpm}} ;$$

dann wurden a-v-Differenzen aus den Prozentwerten gebildet.

Die Ergebnisse der Untersuchungen mit kaltem Corticosteron geben bedingt die Absolutmengen von aufgenommenem Hormon pro Minute und pro 30 g Muskelgewebe an. Die Ergebnisse der Versuche mit markiertem Corticosteron geben die Verschwinde-rate des Tracers in 5 Minuten pro perfundiertem Hinterbein an; sie zeigen folglich nur qualitativ die Kinetik der Hormonaufnahme an.

Während Ruheperfusionen ($n=11$) nahm die Aufnahme von anfänglich $9,44 \pm 1,51$ % auf $5,54 \pm 0,85$ % in der 30. Minute der Perfusion langsam ab. Nach der 30. Minute stieg die Hormonaufnahme wieder an (Tabelle 28). Da während Ruhebedingungen der Perfusionsdruck, pH, Hämatokrit und die Durchblutungsrate konstant waren (siehe 2.3.2.), ist dieses Verhalten aus diesen Parametern nicht zu erklären. Lokale, durch unsere Meßverfahren nicht erfaßbare Vorgänge und Änderungen z.B. in der Proteinbindung durch lokale pH-Erniedrigung sind zu diskutieren.

Der zeitliche Verlauf der Arbeitsperfusionen mit markiertem Corticosteron wurde gegenüber den üblichen Arbeitsversuchen (siehe 2.3.1.) geändert; da während insgesamt 60 Minuten Ruheperfusion ein steady state in der Hormonaufnahme nicht zu erreichen gewesen war (siehe oben), legten wir die Arbeitsphase auf den Zeitpunkt der geringsten Hormonaufnahme. Nach 15 Minuten Erholungsphase brachten wir dann die Muskulatur wiederum zur Kontraktion.

Der zeitliche Verlauf der abgeänderten Arbeitsperfusionen wurde folgendermaßen festgelegt:

- 15 min wash-out-period
- 30 min Ruheperfusion
- 5 min Arbeitsperfusion
- 15 min Erholungsperfusion
- 5 min Arbeitsperfusion
- 15 min Erholungsperfusion

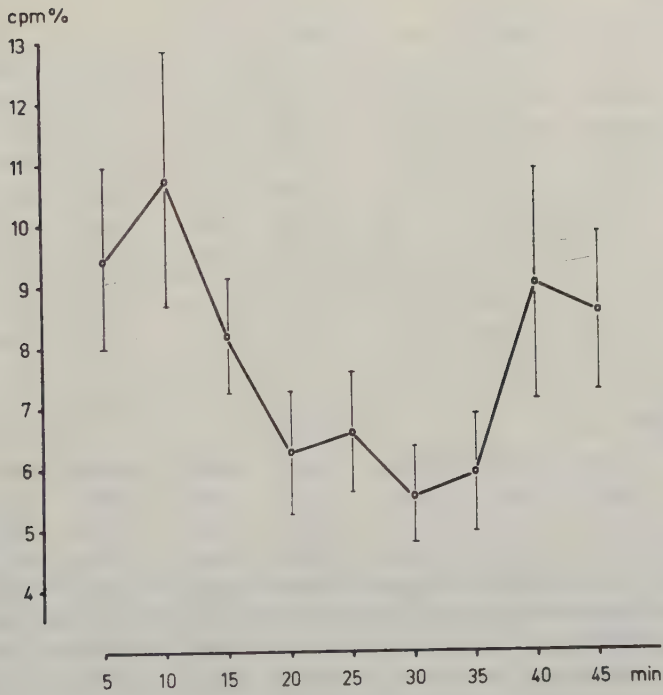


Abb.15 Corticosteron mark. a-v Differenzen in cpm%
Ruheperfusion (n=11)

Tab. 28: Corticosteron a-v-Differenzen in cpm%.

Ohne α -Blocker:

Ratte Nr.	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇	R ₈	R ₉
84	13,00	14,17	12,85	9,42	4,42	5,15	7,36	6,67	8,88
85	21,28	18,32	13,22	10,57	7,89	7,48	8,51	13,26	15,90
86	12,63	12,93	11,43	13,33	11,33	12,03	11,23	8,72	9,72
87	11,59	27,27	8,91	3,22	6,25	2,76	5,37	12,99	5,31
88	6,15	1,63	4,70	2,99	7,93	4,00	6,12	7,50	6,05
89	5,39	6,75	7,20	6,70	6,41	4,26	4,26	24,42	10,10
$\bar{x}$	11,67	13,51	9,71	7,70	7,37	5,94	7,14	12,26	9,32
SEM	$\pm 2,35$	$\pm 3,66$	$\pm 1,38$	$\pm 1,70$	$\pm 0,95$	$\pm 1,3$	$\pm 1,02$	$\pm 2,68$	$\pm 1,54$

Mit α -Blocker:

90	5,49	7,39	6,98	6,81	2,59	5,36	6,23	9,93	11,48
91	5,79	6,97	4,37	2,58	3,46	2,51	0,65	0,13	0,43
92	6,26	4,97	4,91	2,81	1,69	3,20	1,52	1,47	6,57
93	5,65	3,76	7,37	4,00	13,81	5,69	7,86	9,73	14,27
94	10,66	14,17	7,94	6,68	6,85	8,50	6,74	4,80	6,36
$\bar{x}$	6,77	7,45	6,31	4,57	5,68	5,05	4,60	5,21	7,82
SEM	$\pm 0,98$	$\pm 1,80$	$\pm 0,70$	$\pm 0,91$	$\pm 2,21$	$\pm 1,05$	$\pm 1,46$	$\pm 2,03$	$\pm 2,38$

$\bar{x}_{\text{ges}}$	9,44	10,75	8,17	6,28	6,60	5,54	5,98	9,05	8,64
SEM	$\pm 1,51$	$\pm 2,27$	$\pm 0,94$	$\pm 1,08$	$\pm 1,09$	$\pm 0,85$	$\pm 0,91$	$\pm 1,99$	$\pm 1,31$

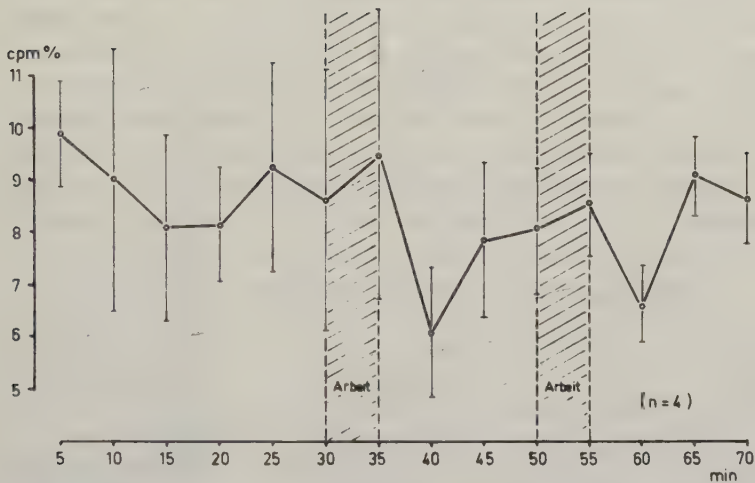


Abb. 16 Corticosteron a-v Differenzen in cpm% (verlängerte Arbeitsperfusionen)

Es zeigten sich während der beiden Arbeitsphasen zwar eine vermehrte Verschwinderate des Corticosteron in das Gewebe gegenüber den vorhergehenden Ruhe- und nachfolgenden Erholungsphasen. Die Unterschiede in den Ergebnissen sind jedoch nicht statistisch signifikant (Tabelle 29). Wir können an Hand dieser Ergebnisse keine vermehrte oder verminderte Aufnahme von Corticosteron in das Gewebe, induziert durch Arbeit, feststellen. Die sich während und nach Arbeit ergebenden Schwankungen in der Aufnahmekinetik erklären sich am ehesten aus den Schwankungen in der Durchblutungsrate (Tabelle 5a) oder aus den während der Arbeit entstehenden pH-Erniedrigungen (siehe 5.3.).

Tab. 29: Corticosteron a-v-Differenzen cpm%.
Arbeitsperfusionen mit α -Blocker.

Nr.	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	A ₁	E ₁	E ₂	E ₃	A ₂	E ₁	E ₂	E ₃
95	8,35	4,64	6,03	9,16	9,27	7,96	7,46	5,77	7,51	-	-	-	-	-
97	11,90	10,89	8,21	7,87	6,78	7,69	7,73	5,56	7,75	8,70	9,02	8,27	9,10	10,62
98	14,16	15,28	13,55	10,61	15,06	15,91	17,91	9,62	12,27	10,41	10,11	5,83	10,70	8,11
99	5,33	5,33	4,91	5,31	6,06	3,33	4,89	3,59	4,09	5,83	6,87	5,88	7,98	7,41
$\bar{x}$	9,93	9,03	8,17	8,23	9,29	8,68	9,49	6,13	7,90	8,31	8,66	6,66	9,26	8,71
SEM	$\pm 1,94$	$\pm 2,50$	$\pm 1,91$	$\pm 1,12$	$\pm 2,04$	$\pm 2,62$	$\pm 2,87$	$\pm 1,26$	$\pm 1,67$	$\pm 1,33$	$\pm 0,95$	$\pm 0,80$	$\pm 0,78$	$\pm 0,97$

4.3.3. Ergebnisse der Zellfraktionierung

Bei der Kern- und Mitochondrialfraktion mußte eine Quenckorrektur durchgeführt werden. Der Korrekturfaktor f ($f = \text{cpm Standard} / \text{cpm Standard} + \text{Probe}$) (70) betrug für die Kernfraktion im Mittel 0,70 und für die Mitochondrialfraktion 0,93 (siehe 4.2.4.). Da die arteriellen cpm-Werte der einzelnen Versuche untereinander nicht genau gleich waren, hielten wir es für richtiger, die intrazelluläre Verteilung des markierten Corticosteron, d.h. die cpm der einzelnen Fraktionen in Prozent auszurechnen. Es ergibt sich dann für das in die Zellen aufgenommene Hormon folgende intrazelluläre Verteilung pro Gramm Muskelfeuchtgewicht, ausgedrückt in Prozent (Tabelle 30) :

Fraktionen	1000 x g	15 000 x g	Überstand
Ruheperfusion (n=9)	12,90 + 3,09	3,91 + 0,34	83,24 + 3,26
Arbeitsperfusion verlängert (n=3)	12,52 + 2,04	4,52 + 0,57	82,93 + 2,58

Eine unterschiedliche subzelluläre Verteilung des Corticosteron auf die drei Fraktionen während Ruhe und Arbeit fand nicht statt. Die Frage, ob mengenmäßig mehr Corticosteron während der verlängerten Arbeitsperfusion aufgenommen worden ist, läßt sich an Hand dieser Ergebnisse nicht beantworten.

Wir interpretieren diese Ergebnisse als eine Bindung des Corticosteron an das intrazelluläre Rezeptorprotein, das sich im "Überstand" und zum geringen Teil bereits am Acceptor in der Kernfraktion befindet (6, 7, 72, 77, 93).

Tab. 30: Corticosteron. Ergebnisse der Zellfraktionierung.
cpm nach Quenchkorrektur umgerechnet auf Prozent.

nach Ruheperfusionen:

Nr.	1000 x g (Kernfrakt.)	15 000 x g (Mitochondrienfrakt.)	Überstand (lösl.Zellfrakt.)
85	6,29	2,94	90,76
86	10,84	3,51	85,63
87	23,88	5,48	70,92
88	7,47	4,77	87,75
89	32,93	4,49	62,55
90	5,63	4,10	90,25
93	11,50	3,24	85,25
94	10,17	3,46	86,35
95	7,47	2,76	89,75
$\bar{x}$	12,90	3,91	85,24
SEM	$\pm 3,09$	$\pm 0,34$	$\pm 3,26$

nach Arbeitsperfusionen (verlängert) :

97	16,61	5,60	77,77
98	10,71	3,66	85,62
99	10,26	4,31	85,41
$\bar{x}$	12,52	4,52	82,93
SEM	$\pm 2,04$	$\pm 0,57$	$\pm 2,58$

4.4. Schilddrüsenhormone, Ergebnisse der Untersuchungen

4.4.1. Vorbemerkung

Der Aufnahme von Schilddrüsenhormonen in die periphere Muskulatur - unabhängig von Vorgängen im Gesamtorganismus während Arbeit - ist bisher relativ wenig Aufmerksamkeit geschenkt worden (59). LEIN et al. (71) und FELT et al. (36) konnten in ihren in vitro-Ver suchen am Rattendiaphragma bzw. an der menschlichen Muskulatur zeigen, daß markiertes T_4 und T_3 wahrscheinlich durch Diffusion in die Muskelzellen aufgenommen werden. TATA (105) konnte mittels Elektrophorese ein cytoplasmatisches Protein als Rezeptor für Schilddrüsenhormone isolieren; OPPENHEIMER et al. (81) gelang es, nucleare Rezeptoren nachzuweisen. Wir haben die Aufnahmekinetik der Schilddrüsenhormone während Ruhe- und Arbeitsperfusionen untersucht und durch Homogenisation und Differentialzentrifugation die intrazelluläre Verteilung der Schilddrüsenhormone während verschiedenen langer Perfusionen gemessen.

4.4.2. Ergebnisse mit "kaltem" T_4

Wir bestimmten zunächst die Konzentrationen von T_4 mittels kompetitiver Proteinbindungsanalyse (siehe 4.1.3.) der arteriellen und venösen Fraktionen von 10 Arbeitsperfusionen. Dem Standardperfu sionsmedium setzten wir $10 \mu\text{g}\%$ ($1,29 \times 10^{-7}\text{M}$) L-Thyroxin zu (siehe 2.2.4.2.). Der gemessene arterielle T_4 -Spiegel lag bei $9,54 \pm 0,18 \mu\text{g}\%$, bei einem VK von 6%. Die Proben aller Fraktionen wurden dreifach bestimmt und der Mittelwert ermittelt.

Einen signifikanten Unterschied der venösen T_4 -Konzentrationen zum arteriellen Mittelwert fanden wir lediglich in den ersten 5 Minuten der Ruheperiode (nach 15 min wash-out-period). Die Differenz zwischen arterieller und venöser T_4 -Konzentration betrug $0,99 \mu\text{g}\%$, also etwa 10% der arteriellen Konzentration. Der zweite Ruhewert der venösen Fraktion lag mit $9,04 \mu\text{g}\%$ noch deutlich niedriger als der arterielle Wert, ist jedoch statistisch nicht mehr signifikant. Die weiteren Konzentrationen der venösen Fraktionen schwanken um den arteriellen Mittelwert, insbesondere während der Arbeitsphase (Tabelle 31). Jedoch lassen sich mit diesen Ergebnissen keine ein-

deutigen Aussagen machen, da die Bestimmungsmethode für die geringen Differenzen zu ungenau sind, und auch nur proteingebundenes und freies T_4 gemeinsam erfaßt werden.

4.4.3. Ergebnisse mit markiertem T_4

Zu dem Standardperfusionsmedium gaben wir 10 µg% L-Thyroxin und als "Tracer" ^{125}J -L-Thyroxin (siehe 4.1.4.). Die Menge des zugegebenen "Tracers" variierte je nach Alter der Substanz. Die Menge wurde empirisch ermittelt: 2 ml Serum sollten etwa 10 000 cpm enthalten. Die arteriellen counts wurden gemittelt und gleich 100% gesetzt. Die venösen counts wurden in Prozent davon errechnet und a-v-Differenzen gebildet.

Es wurden zehn Ruheperfusionsen durchgeführt, davon drei mit Zugabe eines α -Blockers (Regitin^R). Da der α -Blocker keinen Einfluß auf die Ergebnisse hatte, wurden alle Versuchsergebnisse zusammengefaßt (Tabelle 32, Abbildung 17). Die a-v-Differenzen nahmen von R_1 nach R_9 asymptotisch gegen Null ab. Dieses Verhalten stimmt mit den in vitro-Versuchsergebnissen von LEIN et al. (71) und FELT et al. (36) überein. Die - nicht signifikanten - Schwankungen innerhalb des Kurvenverlaufes resultieren möglicherweise aus Ungenauigkeiten in der Bestimmungsmethode, könnten aber auch durch Änderungen in der Microcirculation während der Perfusion, bedingt durch exogene und endogene Faktoren bedingt sein (siehe 5.1.).

Zwei Arbeitsversuche mit markiertem T_4 wurden nach dem üblichen zeitlichen Verlauf durchgeführt (Tabelle 33a, Nr. 67/69) und zwei mit verlängertem Verlauf (siehe auch 4.2.2.) (Tabelle 33b, Nr. 99/100). Sowohl bei Versuch Nr. 69, als auch bei den beiden Arbeitsperfusionsen mit abgeändertem zeitlichen Verlauf waren zu keinem Zeitpunkt Einflüsse der Arbeit auf die Aufnahmekinetik nachzuweisen, Durchblutungsrate und Perfusionsdruck dieser Versuche blieben während der Arbeit nahezu unverändert (Tab. 4/5). Bei Versuch Nr. 67 nahm die Durchblutungsrate von in der Ruhephase im Mittel 7,7 ml scheinbar ab (s. 2.3.2.) auf ca. 3 ml unmittelbar nach der Arbeit. Entsprechend dazu stieg die a-v-Differenz von T_4 von 2,09 cpm% in der Ruhephase auf 11,74 cpm% in den ersten 5 Minuten der Erholungsphase an. Wir nehmen dies als Beweis dafür,

daß Schwankungen in der T_4 -Aufnahme abhängig von der Durchblutung sind (siehe 5.1. und 5.3.).

Tab. 31: Venöse T_4 -Konzentrationen in $\mu\text{g}\%$; der arterielle Mittelwert beträgt $9,54 \pm 0,18 \mu\text{g}\%$ ($n=10$), gemessen mittels kompetitiver Proteinbindungsanalyse.

Arbeitsperfusionen

Nr.	R_1	R_2	R_3	A_1	A_2	E_1	E_2	E_3	E_4
57	8,33	7,98	9,96	10,09	9,90	10,52	-	-	-
58	9,42	9,28	10,28	9,02	7,77	7,52	9,31	-	-
59	6,79	8,84	8,80	8,35	7,87	9,38	9,04	9,51	8,94
60	8,54	8,91	9,01	6,36	7,34	8,85	8,22	7,84	7,18
61	8,85	9,59	9,99	10,04	11,06	10,11	10,23	11,28	10,36
62	6,84	8,03	10,17	10,54	9,06	11,39	15,37	10,01	11,61
63	8,83	10,05	11,68	11,31	12,80	11,15	11,51	11,98	10,80
64	8,80	9,65	9,79	10,25	9,01	9,58	8,33	9,62	10,42
65	11,05	9,16	10,01	9,95	10,41	9,56	9,45	9,17	9,82
66	8,13	9,03	9,35	9,47	9,73	9,39	10,23	9,14	9,80
$\bar{x}$ ges.	8,55	9,04	9,90	9,53	9,49	9,74	10,18	9,81	9,86
SEM	$\pm 0,39$	$\pm 0,21$	$\pm 0,25$	$\pm 0,44$	$\pm 0,53$	$\pm 0,36$	$\pm 0,73$	$\pm 0,47$	$\pm 0,48$

Tab. 32: Thyroxin-Ruheperfusionen, a-v-Differenzen in cpm%.

Nr.	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇	R ₈	R ₉
68	2,15	2,58	2,79	2,58	2,79	1,43	1,43	3,20	0,84
70	1,42	-	0,94	2,40	1,96	1,28	-0,47	0,63	-0,05
84	4,77	2,31	2,74	1,96	3,25	4,26	2,86	2,70	4,26
85	4,68	5,41	3,37	3,44	5,56	3,33	3,92	1,69	1,39
86	4,32	2,60	4,87	-0,34	3,52	-	-0,27	2,93	0,37
88	4,04	6,64	2,74	2,54	4,06	6,77	2,86	2,31	-
89	2,32	4,65	5,67	3,48	1,77	1,04	1,85	2,11	1,97
90	3,22	3,72	2,31	-	1,95	1,30	2,19	1,60	0,82
91	2,18	2,96	1,47	1,41	3,65	0,48	1,37	2,27	1,12
92	1,50	2,35	0,81	-0,06	0,77	2,32	0,89	3,85	1,27
$\bar{x}$	3,06	3,69	2,77	1,93	2,92	2,46	1,66	2,32	1,33
SEM	$\pm 0,41$	$\pm 0,59$	$\pm 0,49$	$\pm 0,45$	$\pm 0,43$	$\pm 0,67$	$\pm 0,43$	$\pm 0,28$	$\pm 0,41$

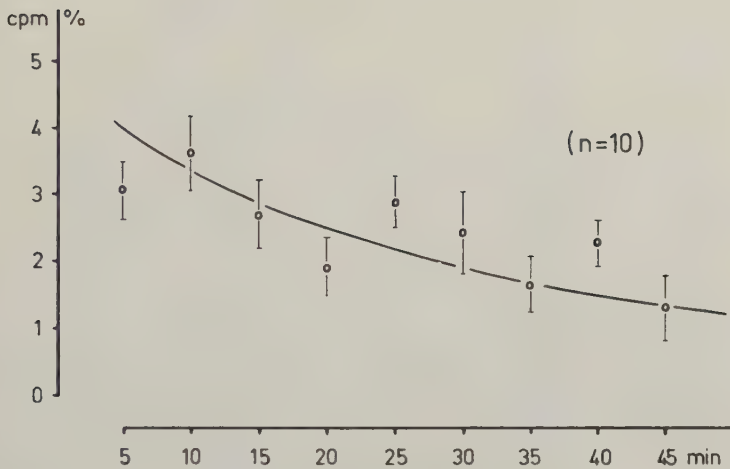


Abb.17 L-Thyroxin, a-v Differenzen in cpm %

In einem Versuch ersetzten wir das Rinderalbumin des Perfusionsmediums durch Haemaccel^R. Die T_4 -Aufnahme in das Gewebe stieg ca. um das 6-fache an gegenüber den Versuchen mit Rinderalbumin. Da T_4 an Haemaccel wesentlich schwächer gebunden wird als an Albumin, war in diesen Versuchen die freie T_4 -Konzentration wesentlich höher als in den übrigen Versuchen. Von LEIN et al. (21) konnte in seinen in vitro-Untersuchungen ebenfalls zeigen, daß nur eine geringe Zugabe von Rinderalbumin zum Inkubationsmedium die Aufnahme von T_4 um den Faktor 10 senken kann. Jedoch fanden wir auch bei dieser proteinfreien Perfusion keinen Einfluß von Muskelkontraktionen auf die T_4 -Aufnahme ins Gewebe.

Tab. 33: T_q -a-v-Differenzen in cpm%, a) Arbeitsperfusionen -
b) verlängerte Arbeitsperfusion -

a) Nr.	R_1	R_2	R_3	A_1	A_2	E_1	E_2	E_3	E_4	E_5
67	0,37	0,47	2,09	2,02	6,95	11,74	11,94	9,76	3,08	3,01
69	2,49	2,26	2,12	3,71	2,86	1,59	3,51	3,87	3,70	-

b) Nr.	R_1	R_2	R_3	R_4	R_5	R_6	A_1	E_1	E_2	E_3	A_2	E_1	E_2	E_3
99	2,79	4,06	3,02	6,52	2,32	3,81	1,72	2,40	2,61	4,11	3,27	1,61	0,05	1,06
100	1,37	2,42	2,56	1,98	5,69	2,15	2,41	3,11	2,47	0,64	1,32	0,09	1,18	0,62

$\bar{x}$	2,08	3,24	2,79	4,25	3,99	2,98	2,06	2,75	2,54	2,37	2,29	0,85	0,61	0,84
-----------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------

Tab. 34: T₃-Ruheperfusionen. a-v-Differenzen in cpm⁸.

Nr.	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇	R ₈	R ₉
93	3,98	2,79	3,91	1,53	3,39	3,55	3,21	3,44	3,61
94	3,80	0,95	1,87	3,48	3,43	1,68	2,09	0,03	0,49
$\bar{x}$	3,69	1,89	2,89	2,50	3,39	2,61	2,65	1,79	2,05

- 76 -

Tab. 35: T₃-Arbeitsperfusionen. a-v-Differenzen in cpm⁸.

Nr.	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	A ₁	E ₁	E ₂	E ₃	A ₂	E ₁	E ₂	E ₃
95	-0,02	2,52	3,50	1,87	-1,05	0,20	-2,36	-0,19	-0,45					
97	0,87	0,38	-0,14	-0,55	1,43	-0,01	-1,50	-1,02	1,44	2,11	0,54	0,88	1,23	0,81
98	3,37	1,92	0,22	3,44	4,63	3,51	5,18	0,24	0,26	2,22	1,24	1,59	4,32	1,76
$\bar{x}$	1,40	1,60	1,19	1,58	1,67	1,23	0,44	-0,32	0,41	2,16	0,89	1,23	2,77	1,28
SEM	$\pm 1,01$	$\pm 0,63$	$\pm 1,15$	$\pm 1,16$	$\pm 1,64$	$\pm 1,13$	$\pm 2,38$	$\pm 0,38$	$\pm 0,55$	$\pm 0,05$	$\pm 0,34$	$\pm 0,33$	$\pm 1,12$	$\pm 0,31$

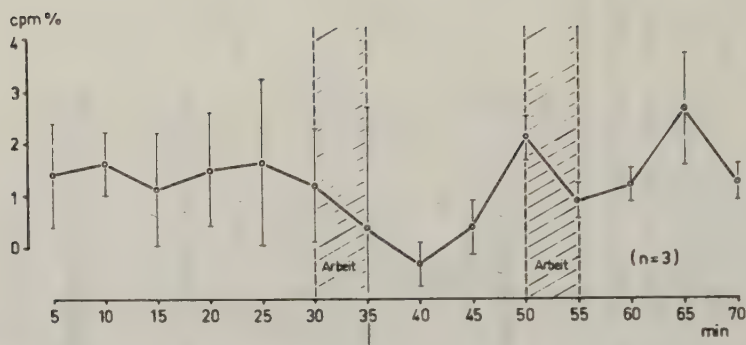


Abb. 18 T₃ a-v Differenzen in cpm% (verlängerte Arbeitsperfusionen)

4.4.4. Ergebnisse mit markiertem T₃

Stichprobenartig führten wir zwei Ruhe- (Tab. 34) und drei Arbeitsperfusionen (Tab. 35) mit ¹²⁵J-Trijodthyronin, arterielle Konzentration 0,2 ug% (2×10^{-8} M) durch. Die Schwankungen in den a-v-Differenzen unterschieden sich nicht zu denen der Perfusionen mit T₄. Ein Einfluß der Muskelkontraktionen auf die Aufnahme war nicht erkennbar.

Eine schnellere Aufnahme von T₃ gegenüber T₄ ins Gewebe, wie sie von LEIN et al. (71) und FELT et al. (36) gezeigt werden konnte, war bei unseren Ergebnissen nicht zu sehen. Dies liegt wahrscheinlich daran, daß wir im Gegensatz zu den oben genannten Autoren mit nahezu physiologischen Hormonkonzentrationen gearbeitet haben, während diese gleiche Konzentrationen von T₄ und T₃ - je $1,3 \times 10^{-7}$ M - verwendet hatten.

4.4.5. Ergebnisse der Muskelzellfraktionierung von T₄ und T₃

Nach Homogenisierung und Differentialzentrifugation (siehe 4.2.) wurden die drei Fraktionen (1000 x g, 15 000 x g, und Überstand) im "Tracer-Lab" eine Minute lang gezählt. Die Ergebnisse wurden

auf counts pro Gramm Muskel umgerechnet. Da ^{125}J mit 60 Tagen eine relativ kurze Halbwertszeit besitzt und die Muskeln jeweils mehrerer Versuche zusammen 1 - 2 Wochen nach den Perfusionsversuchen verarbeitet worden waren, rechneten wir die counts der jeweiligen Fraktionen in Prozent um: die Summe der counts aller drei Fraktionen ergeben 100%.

Für Perfusionen mit T_4 (arterielle Konzentration 10 μg) ergaben sich folgende Werte:

Tabelle 36

	1000 x g	15000 x g	Überstand der 15000 x g
Ruheperfusion (insgesamt 60 min Dauer) (n=7)	20,85 cpm%	18,36 cpm%	60,77 cpm%
Arbeitsperfusion (abgeändert, 85 min Dauer (n=2)	57,76 cpm%	13,23 cpm%	29,09 cpm%

Die sich aus diesen Werten ergebende intrazelluläre Verteilung des markierten T_4 zeigt eine vermehrte Bindung an die Zellkerne bei Arbeit. Da die Arbeitsperfusionen jedoch 25 min länger dauerten als die Ruheperfusionen, scheint es wahrscheinlicher, daß die vermehrte Bindung an die Zellkerne zeitabhängig ist.

Zum Vergleich mit den Ergebnissen der T_4 -Perfusionen haben wir stichprobenartig Perfusionen mit T_3 (arterielle Konzentration 0,2 μg) durchgeführt:

Tab. 37:

	1000 x g	15000 x g	Überstand der 15000 x g Fraktion
Ruheperfusionen (insgesamt 45 min Dauer) (n=1)	14,69 cpm%	29,63 cpm%	56,27 cpm%
Ruheperfusionen (insgesamt 60 min Dauer) (n=2)	33,81 cpm%	20,62 cpm%	45,55 cpm%
Arbeitsperfusionen (60 min Dauer (n=2)	27,82 cpm%	30,43 cpm%	41,73 cpm%
Arbeitsperfusionen (85 min Dauer) (n=3)	68,91 cpm%	4,95 cpm%	26,12 cpm%

Tab. 38: Verteilung von markiertem Thyroxin auf drei Zellfraktionen
nach Ruheperfusion (Angaben in cpm%).

Nr.	1000 x g (Kernfraktion)	15 000 x g (Mitochondrienfrakt.)	Überstand (lösli. Zellfrakt.= Mikrosomalfrakt.)
85	24,45	22,38	53,26
86	15,04	17,24	67,71
87	16,54	18,38	65,07
88	19,71	15,86	64,42
89	21,87	16,96	61,16
90	23,61	14,81	61,57
91	24,77	23,00	52,21
$\bar{x}$	20,85	18,36	60,77
SEM	$\pm 1,46$	$\pm 1,18$	$\pm 2,23$
nach verlängerter Arbeitsperfusion			
98	56,72	13,97	29,22
99	58,80	12,50	28,97
$\bar{x}$	57,76	13,23	29,09

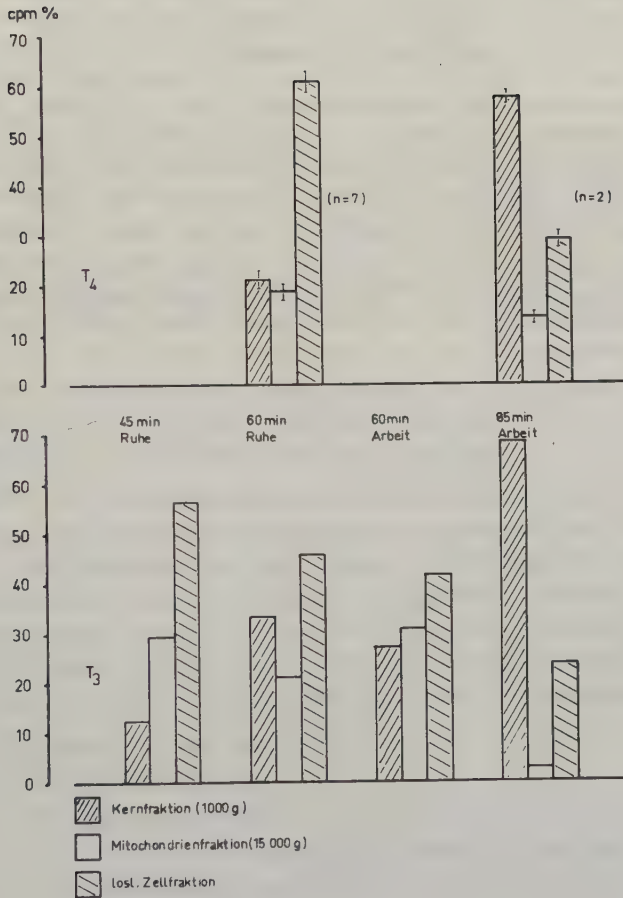


Abb.19 Subzelluläre Verteilung von T_4 und T_3

Die Ergebnisse zeigen bei vergleichbarer Ruheperfusion eine vermehrte Bindung an die Kernfraktionen bei den T_3 -Perfusionen im Vergleich zu den T_4 -Perfusionen (33,81 cpm% gegenüber 20,85 cpm%). Bei einer verkürzten Ruheperfusion sind jedoch nur 14,69 cpm% an die Kernfraktion gebunden und 56,27 cpm% befinden sich in der löslichen Zellfraktion.

Bei 60 Minuten dauernder Arbeitsperfusion sind 27,82 cpm%, bei 85 Minuten dauernder sind aber 68,91 cpm% an die Kernfraktion gebunden. Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit den T_4 -Ergebnissen und lassen den Schluß zu, daß die Bindung der Schilddrüsenhormone an die Kernfraktion eher von der Zeit - allerdings nicht in linearer Beziehung - abhängig sind als von der Stoffwechselaktivität (siehe 5.3.) bzw. von der Muskelkontraktion.

5.

DISKUSSION

5.1.

Teil I - Allgemeine Gesichtspunkte

Bei der Beschäftigung mit den Stoffwechseluntersuchungen und der Messung der Aufnahmekinetik der Hormone an der ruhenden und arbeitenden Muskulatur stellten sich uns einige Probleme, die hier vorweg angesprochen werden sollen.

Von mehreren Autoren konnte sowohl am Menschen als auch am Tier gezeigt werden, daß die Durchblutungsrate während Arbeit in Abhängigkeit von der Intensität der Muskelkontraktionen und dem Trainingszustand der Muskulatur ansteigt (34, 50). Es ändern sich sowohl Druck und Widerstand in den Gefäßen als auch die Anzahl der perfundierten Kapillaren (9, 24). NAKAMURA et al. (74) konnten für die Muskulatur zeigen, daß man zwischen einem nutritiven und nicht-nutritiven "blood-flow" unterscheiden muß. Die Erfassung dieser beiden Durchblutungsgrößen ist nur mit Hilfe komplizierter Clearance-Methoden zu erreichen.

Da Hormone und Substrate für die exogene Energieversorgung der Muskulatur nur über die Blutbahn in die Muskelzellen gelangen können, wird der zentrale Stellenwert dieser Prozesse deutlich. Der Substrataustausch zwischen den Blutgefäßen und dem Interstitium basiert - neben der Bindung an Plasmaproteine, die beeinflußt wird durch Konzentration, Temperatur und pH des Blutes (3, 34, 64, 69, 87) - auf grundsätzlich zwei Mechanismen (88) :

1. Ultrafiltration oder Osmose

2. Molekulardiffusion.

ad 1) - Die Ultrafiltration ist proportional der Differenz aus dem hydrostatischen Druck (P_c) und dem kolloid-osmotischen Druck (Π_c) in den Kapillaren:

$$\text{Ultrafiltration } F = K_F (P_c - \Pi_c) ;$$

der Proportionalitätsfaktor K_F ist abhängig von der Filtrationsoberfläche und der Permeabilität der Kapillärwände (Relation von Porengröße und Molekülgröße).

ad 2) - Die Molekulardiffusion ist proportional der Differenz der Konzentrationen des Substrates auf jeder Seite der Kapillarwand:

$$\text{Molekulardiffusion } M_1 - 2 = PS (c_1 - c_2) ;$$

PS = Proportionalitätsfaktor, Produkt aus Permeabilität und effektive Oberfläche der Membran (Kapillarwand)

$c_{1/2}$ = Substratkonzentrationen auf jeder Seite der Kapillarwand.

Die Permeabilität der Kapillarwände ändert sich während Muskelkontraktionen nicht (64), die Anzahl der durchbluteten Kapillaren und damit die effektive Oberfläche für den Substrataustausch zwischen Blutbahn und Interstitium steigt jedoch bis auf das Doppelte an (90). Damit verkürzt sich die Wegstrecke für die Diffusion von der Blutbahn zur einzelnen Muskelfaser (88).

Aus den angeführten Überlegungen (1 und 2) läßt sich ableiten, daß unter Ruhebedingungen annähernd steady-state-Verhältnisse zu erreichen sind. Sicher nicht erfüllt sind diese Bedingungen zu Beginn und am Ende der Muskelkontraktionen; während der Arbeitsphase sind steady-state-Verhältnisse nur unter der Voraussetzung zu erwarten, daß die Kontraktionen gleich bleiben (eine Voraussetzung, die nicht sicher erfüllbar ist).

Sämtliche Ergebnisse, die während oder am Ende der Muskelkontraktionen gefunden worden sind, sind folglich kritisch zu betrachten, da - ohne jeden Hormoneffekt - nicht regulierbare physikalische Änderungen:

- Druckänderungen im Gewebe
- Änderungen der Kapillaroberfläche durch Eröffnung oder Verschuß von Gefäßprovinzen
- lokale, systemisch nicht erfaßbare pH-Änderungen

zumindest prinzipiell möglich und somit nicht ausschließbar sind (34, 50, 63, 64, 89, 90). Diesem Problem suchten wir durch

1. möglichst identische äußere Untersuchungsbedingungen
2. Sympathektomie und α -Blocker
3. möglichst große Untersuchungszahlen

Rechnung zu tragen.

Ein weiteres Problem wurde bereits unter 2.3.2. angedeutet: In unserem Modell bleibt der "arterielle flow" über die gesamte Perfusionsdauer konstant, ebenso der "venöse flow" in den Ruheperioden (Tabelle 2, Abbildung 7).

Während der Arbeitsperioden sinkt jedoch der "venöse flow" ab (Tabelle 5, Abbildung 7), so daß die aus der venösen Substratkonzentration und dem venösen flow errechnete Aufnahmemenge sicher zu niedrig ist, da aus dem oben Gesagten hervorgeht - und dies ist in der Literatur auch bestätigt (74, 87) - , daß während der Arbeit die Anzahl der durchbluteten Gefäße, und damit der Blutgehalt pro perfundiertem Muskel, größer ist.

Daraus ist sicher zum Teil die erstaunlich geringe errechnete Lipolyse und die nicht signifikante Mehraufnahme der Hormone zu erklären.

Ein weiteres grundsätzliches Problem bei der Beurteilung unserer Versuchsergebnisse ist folgendes: Abgesehen davon, daß bei unserer Versuchsanordnung neben der Muskulatur ca. 5% Knochen-, Fett- und Bindegewebe (94) mit in die Perfusion eingeschlossen ist, besteht das Muskelgewebe selbst nicht aus einheitlichen Muskelfasern (5, 66). Wir müssen unterscheiden zwischen A-, B- und C-Fasern, die entsprechend ihrer Funktion auch eine andere Stoffwechsellage und damit unterschiedliche Enzymmuster aufweisen (5). Die weissen (schnellen) Muskelfasern beziehen ihre Energie vor allem über die anaerobe Glycogenolyse, die roten (langsamen) über den oxydativen Stoffwechsel. Wir haben durch unsere vergleichenden Messungen von Substratkonzentrationen in der Aorta und Vena cava Summen von Einzelvorgängen gemessen, die nur auf die Gesamtheit des perfundierten Gewebes bezogen werden können und nicht auf die Vorgänge an der einzelnen Muskelfaser.

5.2. Diskussionen zum Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsel

Ohne und mit Insulinzusatz wird durch die Muskelkontraktion eine vermehrte Glucoseaufnahme erzielt; gleiche Ergebnisse konnten auch von anderen Untersuchern (8, 94, 103) gefunden werden, wobei diesen Ergebnissen allerdings eine Anzahl anderer Untersuchungen

an Mensch (109) und Tier (68) mit absolutem Insulinmangel gegenüberstehen, wo durch Muskelarbeit keine Steigerung der Glucoseaufnahme zu erzielen war. An dem auch von uns verwendeten Modell konnten BERGER et al. (9) zeigen, daß ketoazidotische Ratten, bei denen man einen absoluten Insulinmangel voraussetzen darf, keine Steigerung der Glucoseaufnahme durch Muskelkontraktionen zeigten. Die gleiche Arbeitsgruppe fand an Normaltieren, daß bei genügend intensiver "wash-out-period" vor Beginn der eigentlichen Untersuchung auch durch Muskelkontraktion keine Steigerung der Glucoseaufnahme zu erzielen war. In beiden Fällen konnte Restitution durch Insulinzusatz, - und zwar schon durch kleine Mengen, vergleichbar den von uns verwendeten "physiologischen Dosen" - , bewirkt werden. Das zeigt, daß dem Insulin, auch bei Muskelarbeit, zumindest eine permissive Rolle in der Glucoseaufnahme in die Zelle zukommt.

Wenn wir auch bei Stichproben bei unseren "insulinfrei" perfundierten Versuchen kein Insulin nachweisen konnten, können geringe Spuren zum Teil an das verwendete Albumin, zum Teil an die Erythrocyten gebundenes Insulin vorhanden gewesen sein. Unter dieser Voraussetzung stimmen unsere Ergebnisse gut mit denen von BERGER et al. (9) überein; unter dieser Voraussetzung wird auch die Glucoseaufnahme, die zu jedem Zeitpunkt bei unseren Versuchen nachweisbar ist, gut verständlich.

Da die Insulinsekretion während der Muskelarbeit sicher nicht ansteigt (78) bzw. unter unseren Versuchsbedingungen bei gleichbleibender Flußrate das arterielle Angebot stets gleich bleibt, ist nach wie vor unklar, welche Faktoren für die gesteigerte Glucoseaufnahme während und nach der Muskelkontraktion verantwortlich sind.

Daß es sich hierbei um einen lokal auftretenden Faktor handelt, konnten BERGSTRÖM und HULTMAN an Untersuchungen am Menschen zeigen (2, 10, 11). Daß eine lokale Hypoxie als wesentliche Ursache in Frage kommt, ist relativ unwahrscheinlich, da noch lange nach Beendigung der Muskelarbeit die Glucoseaufnahme vermehrt ist. Ob der Muskel einen eigenen Faktor bei der Kontraktion freisetzt, der für die vermehrte Glucoseaufnahme verantwortlich ist, erscheint zumindest fraglich (41). Von COUTOURIER et al. (23) wurde bei Untersuchungen am Hund ein beträchtlicher Anstieg der NSILA im

Lymphabflußgebiet während der Muskelarbeit gefunden. Darüber hinaus konnte von mehreren Arbeitsgruppen eine periphere Bindung und Wiederfreisetzung von Insulin am peripheren Gewebe gezeigt werden. Alle diese Untersuchungen haben aber bisher keine Klärung der Ursache für die vermehrte Glucoseaufnahme in die Muskulatur gebracht. Aus den Untersuchungen von KARPATKIN et al. (58) weiß man, daß auch in Abwesenheit von Hormonen das Phosphorylase-system allein durch Muskelkontraktion beträchtlich zu stimulieren ist; diese Aktivierung bewirkt über eine gesteigerte Glycogenolyse eine sofortige Substratbereitstellung und ist somit erste Energiequelle bei einsetzender Muskelarbeit. Auch bei den vorliegenden Untersuchungen fand sich eine die Glucoseaufnahme bei weitem übersteigende Lactatproduktion sowie eine Glycogenverarmung des Muskels.

Daß dem Fettstoffwechsel - den NFS - eine bedeutende Rolle als Energiequelle für die ruhende und arbeitende Muskulatur zukommt, konnte in vielen Untersuchungen gezeigt werden (19, 20, 54, 82). Während der Ruheperfusion fanden wir eine ständige, gleichbleibende NFS-Aufnahme ins periphere Gewebe; nach den Untersuchungen von REIMER et al. (86) werden diese aufgenommenen NFS zu etwa 70% in die intramuskuläre Triglyceridfraktion eingebaut. Unter Arbeitsbedingungen fanden wir allerdings keine weitere Steigerung der NFS-Aufnahme und eher eine Hemmung der Lipolyse, gemessen an der Glycerinfreisetzung, obwohl bei Untersuchungen am Menschen und auch im Tierexperiment eine lebhaft Lipolyse bei Muskelarbeit gefunden wird (19, 20, 61).

Tierexperimentelle Studien haben aber auch gezeigt, daß der Anteil der NFS an der Energiebereitstellung von mehreren Faktoren abhängig ist (44, 61) :

1. von der Dauer der Muskelarbeit,
2. von der Intensität und der Frequenz der durchgeführten Muskelkontraktionen,
3. vom Trainingszustand der Muskulatur, und
4. von der Art der Zusammensetzung des Muskels, d.h. vom Verhältnis der A-, B- und C-Fasern mit ihren unterschiedlichen Enzymmustern.

Bei kurzdauernder, schnell einsetzender submaximaler Arbeit tritt die Glycogenolyse und die Glycolyse ganz in den Vordergrund (61). Da wir untrainierte Normaltiere einer rasch einsetzenden submaximalen Arbeit unterworfen haben, waren alle Voraussetzungen für den ganz im Vordergrund stehenden Kohlenhydratstoffwechsel gegeben. Darüber hinaus waren unserem Perfusat keine lipolytisch wirksamen Substanzen zugesetzt; die erhebliche lipolytische Aktivität des Sympathicus am subcutanen Fettgewebe (92) war durch die Entfernung der sympathischen Ganglien ausgeschaltet. Der Abfall der Glycerinfreisetzung fällt zusammen mit der Steigerung der Lactatproduktion und Ausschwemmung; möglicherweise kommt hier der antilipolytische Effekt von Lactat, wie er für das Fettgewebe mehrfach beschrieben wurde (30,37), zum Tragen.

Faßt man die Ergebnisse der Stoffwechseluntersuchungen zusammen, so fanden wir:

- eine basale Glucoseaufnahme, die durch Insulin erheblich zu steigern ist;
- eine durch Muskelkontraktion allein bewirkte Zunahme der Glucoseaufnahme, die durch Insulin deutlich vermehrt werden kann;
- mit einsetzender Muskelkontraktion eine erhebliche Glycogenolyse;
- eine stetige NFS-Aufnahme unter Ruhebedingungen, bei etwa konstant-bleibender Lipolyse, die bei der Anwesenheit von Insulin deutlich vermindert ist;
- keine Stimulation des Fettstoffwechsels durch kurzfristige submaximale Arbeit bei den von uns gewählten Bedingungen.

Diese Ergebnisse stimmen gut mit denen der Literatur überein, so daß wir annehmen können, daß das gewählte Modell genügend physiologisch ist für die Untersuchung der Kinetik von Corticosteron und Schilddrüsenhormonen am peripheren Gewebe.

5.3. Diskussion zur Aufnahmekinetik der
Schilddrüsenhormone und des Corticosteron

Wir konnten mit unseren Versuchsergebnissen zeigen, daß die Aufnahmekinetik von Schilddrüsenhormonen in die Muskelzellen - bei gleichbleibendem arteriellen Angebot und bei weitgehend konstanter Durchblutungsrate und Perfusionsdruck - durch Muskelkontraktionen allein nicht beeinflußt wird. Bei Verwendung von proteinfreiem Puffer steigt die Aufnahme von T_4 bei identischer arterieller Gesamt- T_4 -Konzentration um das fünf- bis sechsfache sowohl unter Ruhebedingungen als auch während Arbeit an. Muskelarbeit hatte keinen Einfluß auf die subzelluläre Verteilung von Schilddrüsenhormonen, jedoch stellte sich uns die Bindung der markierten Hormone an die Kernfraktion als nicht linear zeitabhängig dar: Durch verlängerte Exposition stieg der Anteil der an die Kernfraktion gebundenen Schilddrüsenhormone an.

Viele, zum Teil gegensätzliche Untersuchungsergebnisse über den Zusammenhang von Muskelarbeit und Schilddrüsenhormonen finden sich in der Literatur:

NAYER et al. (75, 76) bestimmten die "freien T_4 "- und die PBJ-Konzentrationen im Serum von euthyreoten, normalen Personen unmittelbar vor und 30 Minuten nach schwerer, körperlicher Arbeit. Sie fanden einen geringen Abfall der PBJ-Konzentrationen und einen signifikanten Abfall des "freien T_4 ". Wurde derselbe Versuch mit trainierten Personen durchgeführt, so war der Abfall des "freien" T_4 noch ausgeprägter. Diese Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß die T_4 -Utilisation während Muskelarbeit erhöht ist.

Vergleichbare Ergebnisse fand IRVINE (53); er verglich in seinen Untersuchungen die Verschwinderate von markiertem T_4 aus dem Serum von durchgehend trainierenden Athleten mit solchen, die drei Tage lang kein körperliches Training verrichtet hatten. Der T_4 -Umsatz der trainierenden Athleten war signifikant höher als der der nicht-trainierenden. Ähnliche Ergebnisse fand er auch bei Untersuchungen an Pferden (53) : Nach dreimonatigem Training hatte sich die T_4 -Sekretionsrate aus der Schilddrüse um 165%, der periphere T_4 -Umsatz um 265% gesteigert.

KRAUS et al. (65) zeigte in seinen Untersuchungen an schwimmenden Ratten, daß sowohl Muskulararbeit als auch Schilddrüsenhormone in den Mitochondrien der Muskelzellen einen Anstieg oxydativer Enzyme (Glycerin - Phosphat - Dehydrogenase, Succinat - Dehydrogenase und Cytochrom b, c, a) induzieren. Durch orale Gabe von n-Propylthiouracil konnte dieser Anstieg auch bei Muskulararbeit gehemmt werden, bei intraperitonealer Gabe von T_3 stieg die Enzymkonzentration noch weiter an.

Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen stehen die Arbeiten von TRIPTON et al. (106) und WILSON (111), die keinen Zusammenhang von Schilddrüsenhormonen und Muskulararbeit zeigen konnten. Ebenso im Gegensatz zu den oben erwähnten Ergebnissen stehen die Untersuchungen von KACIUBA-USCILKO et al. (59). Sie bestimmten die Gesamt- T_4 -Konzentration im Serum von mit T_4 vorbehandelten Hunden. Sie fanden unmittelbar nach 25-minütiger Arbeit eine signifikante Erhöhung der Gesamt- T_4 -Konzentration im Plasma, allerdings auch einen signifikanten Anstieg des Hämatokrits. Sie schließen daraus, daß die Änderungen der T_4 -Spiegel nur durch Änderungen des Hämatokrits zustande kommen. Änderungen des Hämatokrits, bedingt durch Muskelkontraktion, konnte jedoch weder von uns noch von anderen Arbeitsgruppen gefunden werden (100). Allgemein angenommen wird ein wesentlicher Einfluß der Plasma-Protein-Konzentration und damit Proteinbindung von Schilddrüsenhormonen auf den peripheren T_4 -Umsatz (13, 52). Einflüsse von Temperaturänderungen und pH-Änderungen, wie sie bei Muskulararbeit entstehen, auf die Proteinbindung sind beschrieben worden (13). Der genaue Zusammenhang von Muskulararbeit und peripherem T_4 -Umsatz bzw. T_4 -Sekretion läßt sich zum derzeitigen Stand der Diskussion noch nicht darlegen.

Eine vermehrte T_4 -Aufnahme durch einen gesteigerten intrazellulären T_4 -Stoffwechsel, wie er von BERNSTEIN et al. (12) an der Leber von Ratten, die mit Phenobarbital und Chlordan (zur Enzyminduktion) behandelt worden waren, gefunden worden war, konnte von uns durch Muskelkontraktion allein an der Muskulatur nicht nachgewiesen werden. Es besteht heute kein Zweifel mehr, daß Schilddrüsenhormone Bindungsstellen am Zellkern besitzen (81, 105, 108) und über DNA-abhängige

RNA-Synthese und somit Induktion von mitochondrialen Enzymen am Zielorgan wirken (81, 89). Geklärt ist bisher jedoch noch nicht, ob T_4 und T_3 oder letztlich nur T_3 allein das "stoffwechselaktive" Hormon ist und T_4 immer erst intrazellulär deiodiert wird (15, 79, 98). OPPENHEIMER et al. (81) konnten an der Rattenleber und -niere spezifische Bindungsstellen nachweisen, die von T_4 nur zu ganz geringem Teil besetzt werden können. Dies wäre ein Hinweis auf die alleinige Wirksamkeit von T_3 .

Interessant wäre für uns in diesem Zusammenhang zu wissen, ob die von uns gefundene, bei verlängerter Perfusion vermehrte Hormonbindung an die Kernfraktion dadurch zustande kommt, daß T_4 deiodiert wird zu T_3 und dann erst eine Bindung an den nucleären Rezeptor möglich ist. Eine stichprobenartige Bestimmung des freien J mittels Auftrennung an der Sephadex-Säule brachte keine befriedigenden Ergebnisse.

Da die Zeit zwischen erhöhtem arteriellem Schilddrüsenhormonspiegel und vermehrter Bindung am nucleären Rezeptor - laut unseren Ergebnissen - relativ lange dauert, konnten wir einen Einfluß der Schilddrüsenhormone weder auf den Kohlenhydrat- noch auf den Fettstoffwechsel in unseren Versuchen nachweisen.

Eine vergleichende Betrachtung der Aufnahmekinetik von Schilddrüsenhormonen und Steroidhormonen zeigte unterschiedliches Verhalten während der Ruheperfusionen. Während die arterio-venösen Differenzen der T_4 -Konzentrationen pro Zeiteinheit ständig abnahmen, stiegen die des Corticosteron gegen Ende der Perfusionen signifikant an. Da beide Hormone jeweils im selben Versuch gemessen wurden, scheiden unterschiedliche technische Gegebenheiten in der Perfusion, wie Druck, Durchblutungsrate oder pH-Wert als Erklärung für dieses unterschiedliche Verhalten aus. Unterschiede im Diffusionsverhalten, in der Bindung an Plasmaproteine bzw. an intrazelluläre Rezeptoren müssen deshalb als Gründe für das unterschiedliche Verhalten beider Hormone diskutiert werden.

Ebenso wie bei den Schilddrüsenhormonen konnte ein Einfluß von Muskularbeit auf die Corticosteronaufnahme in die Muskelzelle nicht gezeigt werden.

Da Corticosteron als lipoidlösliche Substanz frei permeabel zwischen Intravasalraum und Cytoplasma ist und die Bindung der Steroidhormone an die cytoplasmatischen Rezeptorproteine dem Massenwirkungsgesetz unterliegen (6, 7, 72, 93), können unsere Versuchsergebnisse als direkter Parameter für die intrazelluläre Corticosteronutilisation betrachtet werden. Diese wird durch kurzfristige Arbeit nicht gesteigert. Als Einschränkung muß allerdings das unter 5.1. über die Rolle der Durchblutung Gesagte hinzugefügt werden. Die nicht signifikanten Schwankungen in den a-v-Differenzen des Corticosteron während der Arbeitsphasen interpretieren wir als eine Auswirkung dieser Durchblutungsänderungen.

Die Serumkonzentrationen von Corticosteron unterliegen nicht nur einem sehr starken tageszeitlichen Rhythmus, sondern reagieren sehr stark auf Stresssituationen jeglicher Art (77). Es erscheint uns daher als wahrscheinlich, daß die Aufnahmekinetik der Steroidhormone während Muskelarbeit eher vom arteriellen Angebot und der Interaktion mit Transcortin (1) abhängt, als von der intrazellulären Utilisation.

Die von uns gemessene subzelluläre Verteilung von Corticosteron deckt sich mit dem bekannten, genau untersuchten Wirkungsmechanismus (siehe auch unter 4.3.) der Steroidhormone (6, 7, 72, 93, 107). Der größte Teil des Corticosteron war nach den Perfusionen (sowohl nach Ruhe- als auch nach Arbeitsperfusionen) in der löslichen Zellfraktion gebunden. Nur zum geringeren Teil war bereits eine Bindung an den Kern erfolgt. Kein Einfluß von Muskelkontraktionen auf die subzelluläre Verteilung konnte von uns nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu den Schilddrüsenhormonen war auch bei verlängerter Exposition keine vermehrte Bindung an die Kernfraktion erfolgt. Als Ursache dafür kommt in Betracht, daß der intrazelluläre Transport - vom Rezeptorprotein zum nucleären Acceptor in der Muskelzelle - bei den Steroidhormonen entweder auf Grund unterschiedlicher Transportmechanismen oder Unterschieden im Diffusionsverhalten länger dauert. Möglicherweise spielt auch ein unterschiedlicher intrazellulärer Stoffwechsel beider Hormone hierbei eine entscheidende Rolle.

Ein Einfluß des Corticosteron auf den Kohlenhydrat- und Fettstoff-

wechsel konnte nicht nachgewiesen werden, was sich auch hier - wie bei den Schilddrüsenhormonen - aus dem Wirkungsmechanismus, der zeitabhängig (57) ist, erklärt.

Ein - während Muskelkontraktionen - vergleichbares Verhalten der Steroidhormone und der Schilddrüsenhormone mit dem des Insulin - periphere intravasale oder interstitielle Bindung während Ruhebedingungen und Wiederfreisetzung unter Muskelkontraktionen (27, 31, 85, 100) - konnten wir in keinem Fall nachweisen. Dies erklärt sich wahrscheinlich sowohl aus der unterschiedlichen chemischen Struktur und dem unterschiedlichen Wirkungsmechanismus:

- Insulin unterliegt auf Grund seiner Peptidstruktur anderen Mechanismen in der Diffusion, der Bindung an Plasmaproteine und dem Verhalten an biologischen Membranen.
- Für Insulin gilt als gesichert, daß es an Membranrezeptoren gebunden wird und über den Adenylcyclase-cAMP-Weg die Permeabilität für spezifische Moleküle (L-Glucose) und Ionen (K^+) erhöht, während Schilddrüsen- und Steroidhormone intrazelluläre Rezeptoren besitzen und die Synthese von mitochondrialen Enzymen induzieren.

6.

ZUSAMMENFASSUNG

Das Modell der offenen Perfusion der Hinterbeinmuskulatur der Ratte wurde hinsichtlich seiner physiologischen Integrität unter Ruhe- und Arbeitsbedingungen überprüft und verbessert. Das Verhalten der in der Literatur angegebenen und gesicherten physikalischen Parameter (Perfusionsdruck, Durchblutungsrate, pH-Wert, Hämatokrit) sowie der Parameter des Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsels wurden als Beweis für die Validität des Modells genommen.

Änderungen der physikalischen Parameter, die während der Muskelkontraktionen zu Störungen des "steady-state" führen und so die Interpretation der Ergebnisse des Stoffwechsels und der Hormonkinetik erschweren, wurden eingehend erörtert.

An Normaltieren wurde der isolierte Einfluß von Corticosteron, L-Thyroxin und Trijodthyronin auf den Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsel untersucht; gleichzeitig wurde die Aufnahmekinetik dieser Hormone in die periphere Muskulatur und deren subzelluläre Verteilung in Abhängigkeit von der Zeit unter Ruhe- und Arbeitsbedingungen gemessen.

Unter den gewählten Versuchsbedingungen konnte eine Beeinflussung des Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsels durch die einzelnen Hormone statistisch nicht gesichert werden.

Deutliche Unterschiede fanden sich in der Aufnahmekinetik der beiden Hormone: Während die Aufnahme von Schilddrüsenhormonen in die periphere Muskulatur mit zunehmender Perfusionsdauer kontinuierlich abnahm, stieg die Corticosteronaufnahme bis zum Untersuchungsende langsam an. Während der Muskelkontraktionen fand sich insgesamt eine geringe Mehraufnahme der untersuchten Hormone in das periphere Gewebe im Vergleich zu den Untersuchungen bei Ruhe; statistisch konnte dieser Unterschied aber nicht gesichert werden.

Bei der Untersuchung der subzellulären Verteilung der untersuchten Hormone fand sich der Hauptanteil des Corticosterons stets in der löslichen Zellfraktion; Muskelarbeit und Perfusionsdauer hatten darauf keinen Einfluß. Im Gegensatz dazu fand sich bei verlängerter

Perfusion nahezu das gesamte Thyroxin (und Trijodthyronin) in der Kernfraktion, bei kurzer Perfusionsdauer in der löslichen Zellfraktion; dieser Unterschied war statistisch zu sichern. Muskelkontraktionen hatten keinen Einfluß auf die subzelluläre Verteilung der Schilddrüsenhormone.

Die gewonnenen Ergebnisse wurden mit den aus der Literatur bekannten Daten verglichen und eingehend diskutiert.

SUMMARY

The model of non-recycling perfusion of the hind-limb muscles of the rat was investigated. Its physiological integrity under the conditions of rest and work was improved.

The physical parameters of perfusion-pressure, flow-rate, pH, haematocrite and the parameters of carbohydrate and fat metabolism were compared with those described in literature.

The validity of the model was proven by the congruence of these parameters.

Any changes of the physical parameters, leading to disturbances of the steady-state during muscle contraction made the interpretation more difficult when the results of metabolism and peripheral hormone kinetics were discussed. These changes were taken into consideration.

The isolated influence of corticosterone, L-thyroxine and L-triiodothyronine on carbohydrate and fatty acid metabolism was examined in normal animals. At the same time, the hormone uptake into the peripheral muscles and its subcellular distribution in relation to time was measured under conditions of rest and work.

Under the condition of this model an influence of the single hormones on carbohydrate and free fatty acid metabolism could not be proven statistically.

Clear differences could be found in the uptake of the two hormones. The uptake of thyroid hormones into peripheral muscles diminished continually by increasing time of perfusion, whereas the corticosterone uptake increased slowly towards the end of perfusion time. During the muscle contractions a slight additional uptake of the hormones in the peripheral tissue was found, compared to the experiments under conditions of rest. The difference was not statistically significant.

In the examinations of the subcellular distribution of the hormones, the main part of corticosterone was always found in the soluble fraction. Muscle contractions and time of perfusion did not influence these results.

In contrast to this almost all the thyroxine (triiodothyronine) could be found in the nuclear fraction, when the time of perfusion was increased, whereas it was found in the soluble fraction when the time of perfusion was shortened. This difference was statistically significant.

Muscle contractions had no influence on the subcellular distribution of the thyroid hormones.

These results were compared and discussed with those described in literature.

7. LITERATURVERZEICHNIS

1. ACS, Z., E.STARK:
The role of transcortin in the distribution of corticosteron in the rat.
Horm.Metab.Res. 5, 279-282 (1973)
2. AHLBORG, B.J., L.G.BERGSTRÖM, E.HEILLMAN:
Muscle glycogen and muscle electrolytes during prolonged physical exercise.
Acta Physiol.Scand. 70, 129. (1967)
3. APPELGREN, L.:
Perfusion and diffusion in shock. A study of disturbed tissue-blood exchange in low flow states in canine skeletal muscle by a local clearance technique.
Acta physiol.Scand.Suppl. 378, 1 (1972)
4. ARTURSON, G., I.KJELLMER:
Capillary permeability in skeletal muscle during rest and activity.
Acta Physiol.Scand. 62, 41-45 (1974)
5. BASS, A., D.BODIZKA, S.EYER, S.HOFER, S.PETTE:
Metabolic differentiation of distinct muscle types at the level of enzymatic organisation.
Europ.J.Bioch. 10, 198-206 (1969)
6. BAXTER, J.D., G.M.TOMKINS:
Specific cytoplasmatic glucocorticoid hormone receptors in hepatoma tissue culture cells.
Proc.Nat.Acad.Sci., USA, 68, pp. 932-937 (1971)
7. BAXTER, J.D., G.ROUSSEAU, M.C.BENSON, R.L.GARCIA, J.ITO, G.M.TOMKINS:
The role of DNA and specific cytoplasmatic receptors in glucocorticoid action.
Proc.Nat.Acad.Sci., USA, 69, pp. 1892-1896 (1972)
8. BEHRENS, M.:
Untersuchungen an isolierten Zell- und Gewebsbestandteile. I. Mitteilung: Isolierung von Zellkernen des Kalbsherzmuskels.
Z.Physiol.Chemie 209, 59-79 (1932)
9. BERGER, M., S.HAGG, N.B.RUDERMAN:
Glucose metabolism in perfused skeletal muscle.
Biochem.J. 146, 231-238 (1975)

10. BERGSTRÖM, J.E., L.HERMANSEN, E.HULTMAN, B.SALTIN:
Diet, muscle glycogen and physical performance.
In: Studies on muscle metabolism of glycogen
and active phosphate in man with special
reference to exercise and diet.
Scand.J.Clin.Lab.Invest., Suppl. 94 (1967)
11. BERGSTRÖM, H., E.HULTMAN:
Muscle glycogen synthesis after exercise:
an enhancing factor localized to the muscle
cells in man.
Nature 210, 309-310 (1975)
12. BERNSTEIN, G., S.A.ARTZ, J.HASSEN, J.H.OPPENHEIMER:
Hepatic accumulation of ¹²⁵I-thyroxine in the
rat: Augmentation by phenobarbital and chlordanes.
Endocrinology 82, 406-411 (1968)
13. BERNSTEIN, G., J.H.OPPENHEIMER:
Factors influencing the concentration of free
and total thyroxine in patients with nonthyroidal
disease.
J.Clin.Endocrin. 26 (1966)
14. BOLME, P., D.J.GAGNON:
The effect of vasodilating drugs and vaso-
constrictor nerve stimulation on oxygen uptake
in skeletal muscle.
Europ.J.of Pharmacology 20, 300-307 (1972)
15. BRAVERMAN, L.E., S.H.INGBAR, K.STERLING:
Conversion of thyroxine triiodothyronine in
athyreotic human subjects.
J.Clin.Invest. 49, 855 (1970)
16. BÜHRING, H., F.HOCKEMEYER:
Modelluntersuchungen zum Energiestoffwechsel
des Skelettmuskels.
Biochem.Z. 346, 382-386 (1976)
17. BUSNARDO, B., M.E.GIVELLI, L.VAROTTO, A.GIACOBBI:
Computer analysis of early thyroxine distribution
in thyrotoxicosis and hypothyroidism.
Horm.Metab.Res. 6, 202-207 (1974)
18. CAMPBELL, J., A.D.MARTUCCI, G.R.GREEN:
Plasma albumin as an acceptor of FFA.
Biochem.J. 93, 183-189 (1964)
19. CARLSON, L.A. B.PERNOW:
Studies on blood lipids during exercise.
II. The arterial plasma free fatty acid concen-
tration during and after exercise and its
regulation.
J.Labor.Clin.Invest. 58, 678-681 (1961)

20. CARLSON, L.A., L.G.EKELUND, L.ÖRÖ:
Studies on blood lipids during exercise.
Arterial concentration of plasma free fatty
acids and glycerol during and after prolonged
exercise in normal men.
J.Labor.Clin.Med. 61, 724-729 (1963)
21. CAVALIERI, R.R., G.L.SEARLE:
The kinetics of distribution between plasma
and liver of ¹³¹I-labeled L-thyroxine in men:
Observation of subjects with normal and decreased
serum thyroxine binding globulin.
J.Clin.Invest. 45, 939-949 (1966)
22. CHAPLER, C.K., W.N.STAINSBY:
Carbohydrate metabolism in contracting dog
skeletal muscle in situ.
Am.J.Physiol. 215, 995-1004 (1968)
23. COUTOURIER, E., E.RASIO, V.CONARD:
Insulin in plasma and lymph and tissue glucose
uptake in the exercising hind limb of the dog.
Horm.Metab.Res. 3, 382-386 (1971)
24. CRONE, C., N.LASSEN:
Capillary permeability.
Munksgaard, Copenhagen, 351 (1970)
25. CURIS-PRIOR, P.B., T.HANLEY:
A fat mobilizing factor in rat serum.
Acta endocr. 74, 409-416 (1973)
26. DIEM, K.:
Documenta Geigy, Wissenschaftl.Tabellen,
8. Auflage, Basel 1973.
27. DIETERLE, C., H.OBERNDORFER, P.DIETERLE:
Fixation und Dissoziation von Insulin am peri-
pheren Gewebe während Ruhe und Arbeit. Unter-
suchungen am perfundierten Hinterbein der
Ratte.
Verh.Dtsch.Ges.Inn.Med. 80, 1308-1311 (1974)
28. DIETERLE, C., R.GÄRTNER, P.DIETERLE:
Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsel der Skelett-
muskulatur unter Ruhebedingungen und bei kurz-
fristiger submaximaler Arbeit am Modell des
perfundierten Hinterbeins der Ratte.
Res.Exp.Med. 168, 23-33 (1976)
29. DIETERLE, P., C.WÜLFERT-HELDRIICH, J.HENNER, K.SCHWARZ:
Erfahrungen mit einer kolorimetrischen Methode
zur Bestimmung der nicht veresterten Fettsäuren
im Serum.
Z.Klin.Chem.Biochem. 5, 153-155 (1968)

30. DIETERLE, P., C.DIETERLE, P.BOTTERMANN, K.SCHWARZ:
In vitro-Untersuchungen zur antilipolytischen
Wirkung von Milchsäure.
Diabetologia 5, 238 (1969)
31. DIETERLE, P., B.BIRKNER, K.H.GMEINER, P.WAGNER,
F.ERHARDT, J.HENNER, C.DIETERLE:
Release of peripherally stored insulin during
acute muscular work in man.
Horm.Metab.Res. 5, 316-322 (1973)
32. DUNCOMBE, W.G.:
The colorimetric determination of nonesterified
fatty acids in plasma.
Clin.Chim.Acta 9, 122 (1964)
33. DRUMMOND, G.J., J.P.HARWOOD, C.A.POWELL:
Studies on activation of phosphorylase in
skeletal muscle by contraction and by epinephrine.
J.Biol.Chem. 244, 4235 (1969)
34. ERIKSSON, E., R.MYRHAGE:
Microvascular dimension and blood flow in
skeletal muscle.
Acta physiol.scand. 86, 211 (1972)
35. FARRIS, E.J., J.Q.GRIFFITH:
The rat in Laboratory Investigation.
Hafner Publishing Comp. 1971 N.Y.
36. FELT, V., P.HUSEK:
The different uptake of triiodothyronine and
thyroxine by adipose tissue as compared with
muscle or leucocytes in man.
Physiologia Bohemoslevaca 22 (1973)
37. FREDHOLM, B.B.:
Fat mobilisation and blood lactate concentration
in muscle metabolism during exercise.
Plenum Press, New York-London (1971)
38. FOLKOW, B., U.HAGLUND, M.JODAL, O.LUNDGREN:
Blood flow in the calf muscle of man during heavy
rhythmic exercise.
Acta Physiol.Scand. 81, 157-163 (1971)
39. GAUER, O.H., K.KRAMER, R.JUNG:
Physiologie des Menschen.
Urban & Schwarzenberg, München-Berlin-Wien
Bd. 4 (1971)
40. GERB, A.:
Eine verbesserte fluorimetrische Methode zur
Bestimmung von Cortisolspiegeln im Serum.
Dissertation, Universität München, 1969.

41. GOLDSTEIN, M.S.:
Muscular exercise and subsequent glucose utilization.
In: On the nature and treatment of diabetes.
Ed. by B.S.Leibel and G.A.Wrenshall,
Amsterdam, Excerpta Medica Foundation,
308-320 (1965)
42. GOODMAN, M.N., M.BERGER, N.B.RUDERMAN:
Glucose metabolism in skeletal muscle at rest.
Diabetes 23, 881-888 (1974)
43. HAGENFELDT, L., J.WAHREN:
Metabolism of free fatty acids and ketone bodies
in skeletal muscle.
In: Muscle metabolism during exercise.
Plenum Press, New York-London (1971)
44. HAVEL, R.J.:
Influence of intensity and duration of exercise
on supply and use of fuels.
In: Muscle metabolism during exercise.
Ed. by B.Pernow and B.Saltin, New York-London,
Plenum Press, 315-325 (1971)
45. HOGEBOOM, G.H., W.C.SCHNEIDER, G.E.PALAE:
Cytochemical studies of mammalian tissues.
Isolation of intact mitochondria and sub-
microscopic particulate material.
J.biol.Chem. 172, 619 (1948)
46. HECHTER, O, G.LESTER:
Cell permeability and hormone action.
Recent Progress in Hormone Research 16, 139 (1960)
47. HORN, K., J.HENNER, P.C.SCRIBA:
Mechanisierte Analytik von Schilddrüsenhormonen
im Serum: Competitive Proteinbindungsanalyse von
Thyroxin, T₃-in vitro-Test und radioimmunologische
Bestimmung des Gesamt-Trijodthyroxin.
48. HUDLICKA, O.:
Uptake of substrates in isolated contracting slow
and fast muscles in situ in relation to fatigue.
In: Advances in Experimental Medicine and Biologie
Bd. 11 (1971)
49. HUDLICKA, O.:
Differences in development of fatigue in slow and
fast muscles.
In: J.Keul, Limiting factors of physical performance.
G. Thieme, Stuttgart (1971)

50. HUDLICKA, O.:
Muscle blood flow: its relation to muscle metabolism and function.
Swets Zeitlinger BV Amsterdam 1973.
51. HOHORST, H.J.:
Lactat-Bestimmung mit Lactatdehydrogenase und DPN.
In: Bergmeyer, H.: Methoden der enzymatischen Analyse. Weinheim/Bergstrasse, Verlag Chemie 1962.
52. INGBAR, S.H., N.FREINKEL:
Regulation of the peripheral metabolism of thyroid hormones.
Recent Progress in Hormone Research 16, 353 (1960)
53. IRVINE, C.H.G.:
Effect of exercise on thyroxine degradation in athletes and non-athletes.
J.Clin.Endocr. 28, 942 (1968)
54. ISSEKUTZ, B., H.I.MILLER, P.PAUL, K.RODAHL:
Source of fat oxidation in exercising dogs.
Am.J.Physiol. 207, 583-589 (1964)
55. JÄHRHULT, J., S.MELLANDER:
Autoregulation of capillary hydrostatic pressure in skeletal muscle during regional hypo- and hypertension.
Acta physiol.scand. 91, 32-41 (1974)
56. KAPPELER, H.:
Zur Pharmakologie der Lipolysehemmung.
Diabetologia 2 (1966)
57. KARLSON, P., O.E.SEKERIS:
Biochemical Mechanism of Hormone Action.
Acta Endocrin. 53, 505-518 (1966)
58. KARPATKIN, S., E.HELMREICH, C.F.CORI:
Regulation of glycolysis in muscle. II. Effects of stimulation and epinephrine in isolated frog sartorius muscle.
J.biol. Chem. 239, 3139-3145 (1964)
59. KACIUBA-UŚCİLKO, H., Z.BRZEZINSKA, S.KOZŁOWSKI:
Changes in blood thyroxine level during physical exercise in dogs.
Bulletin de L'Academie Polonaise des Sciences, Série des sciences biologiques, Cl.V.Vol.XXII, 2 (1974)
60. KEMP, A., A.J.M.KITS von HEIJNINGEN:
A colorimetric micro-method for the determination of glycogen in tissues.
Biochem.J. 56, 646-651 (1954)

61. KOIVISTO, V.A., H.K.AKERBLOM, M.K.KIVILUOTO:
Hormonal and metabolic effects of exercise
in the severely streptozotocin diabetic rat.
Diabetologia 10, 329-335 (1974)
62. KEUL, J., E.DOLL, D.KEPPLER:
Zum Stoffwechsel der Skelettmuskulatur.
I. Glucose, Lactat, Pyruvat und NFS.
Pflügers Archiv 301, 198-213 (1968)
63. KEUL, J.:
Limiting factors of physical performance.
G.Thieme, Stuttgart (1971)
64. KJELLMER, I.:
The effect of exercise on the vascular bed of
skeletal muscle.
Acta Physiol.Scand. 62, 18-30 (1964)
65. KRAUS, H., R.KINNE:
Hormonal regulation in muscle training.
In: Limiting factors of physical performance.
G.Thieme, Stuttgart (1971)
66. KUBISTA, O., J.KUBISTOVA, D.PETTE:
Thyroid hormone induced changes in the enzyme
activity pattern of energy-supplying metabolism
of fast (white), slow(red), and heart muscle
of the rat.
Europ.J.of Biochem. 18 (1971)
67. KREUTZ, F.H.:
Enzymatische Glycerinbestimmung.
Klin.Wschr. 7, 362-368 (1962)
68. MOXNESS, K.E., G.S.MOLNAR, W.F.McGUSKIN:
Exercise and blood glucose concentration in
intact and pancreatectomized dogs.
Diabetes 13, 37-43 (1964)
69. MOMMAERTS, W.F.H.M.:
Content of energy-rich compounds.
In: *Limt.Fact.of Phys.Perf.*, G.Thieme Stuttgart
(1971)
70. MÜLLER, O.A.:
Zum Wirkungsmechanismus des adrenocorticotropen
Hormons: Die subzelluläre Verteilung von
³H-ACTH in der Rattennebenniere.
Dissertation, Universität München, 1968.
71. LEIN, A., R.DOWBEN:
Uptake and binding of thyroxine and triiodthyronine
by rat diaphragma in vitro.
Am.J.Physiol. 200, 1029 (1961)

72. LUTZ, J.H., R.J.GREGERMAN, S.W.SPAULDING, R.B.HORNICK, A.T.J.DAWKINS:
Thyroxine binding protein, free thyroxine and thyroxine turnover. Interrelationships during acute infectious illness in man.
J.Clin.Endocrin.Metab. 35, 230 (1972)
73. MILLER, H., B.ISSEKUTZ, K.RODAHL:
Effect of exercise on the metabolism of fatty acids in the dog.
Am.J.Physiol. 205, 167 (1973)
74. NAKAMURA, T., T.SUZUKI, K.TSUIKI, S.TOMINAGA:
Non-nutritional blood flow in skeletal muscle determined with hydrogen gas.
Tohoku J.Exp.Med. 106, 135 (1972)
75. NAYER De, P., P.MALVAUX, M.OSTYN, H.G.Van den SCHRIECK, C.BECHERS, M.De VISSCHER:
Serum free thyroxine and binding protein after muscular exercise.
J.Clin.Endocrin. 28, 714 (1968)
76. NAYER De, P., M.OSTYN, M.De VISSCHER:
Effet de L'entraînement sur le faux de la thyroxine libre chez L'athlète.
Ann. d'Endocrin. 31, 721 (1970)
77. NEMETH, S., M.VIGAS, A.STRAKOVA:
Time on level of increased corticosterone necessary for induction of liver thyroxine-amino-transferase in rats subjected to trauma.
Horm.Metab.Res. 5, 282 (1973)
78. NIKKILÄ, E.A., M.TASKINEN, T.A.MIETTINEN, R.PELKONEN, H.POPPIUS:
Effect of muscular exercise on insulin secretion.
Diabetes 17, 209-218 (1968)
79. NICOLOFF, J.T., J.C.LOW, J.H.DUSSAULT, D.A.FISHER:
Simultaneous measurement of thyroxine and triiodothyronine peripheral turnover kinetics in man.
J.Clin.Invest. 51, 473 (1972)
80. OBERNDORFER, H.:
Dissertation, Universität München, in Vorbereitung.
81. OPPENHEIMER, J.H., D.KOERNER, H.L.SCHWARTZ, M.J.SURKS:
Specific nuclear triiodothyronine binding sites in rat liver and kidney.
J.Clin.Endocr.Metab. 35, 330 (1972)
82. PAUL, P.:
Uptake and oxidation of substrates in the intact animal during exercise.
In: Muscle metabolism during exercise.
Ed. by B.Perno and B.Saltin, New York-London, Plenum Press, 1971.

83. PISTER, W.:
Zur biologischen ACTH-Bestimmung an der akut
hypophysektomierten Ratte.
Dissertation, Universität München, 1973.
84. RASIO, E.A.:
The displacement of insulin from blood capillaries.
Diabetologia 5, 416-419 (1969)
85. RASIO, E.A., M.J.WICHELOW, W.J.H.BUTTERFIELD, B.H.HICKS:
Insulin fixation and glucose uptake by forearm
tissues in response to infusions of physiological
amounts of insulin in non-diabetic subjects.
Diabetologia 8, 244-249 (1972)
86. REIMER, F., G.LÖFFLER, G.HENNIG, O.H.WIELAND:
The influence of insulin on glucose and fatty
acid metabolism in the isolated perfused rat hind
quarter.
Hoppe-Seylers Z.Physiol.Chem. 356, 1055-1066 (1975)
87. RENKIN, E.M.:
The nutritive-shunt-flow hypothesis in the skeletal
muscle.
Circulation Research 28-I.21 (1971)
88. RENKIN, E.M.:
Blood flow and transcapillary exchange in skeletal
muscle.
Fed.Proc. 24, I (1965)
89. RODBARD, D.:
Theory of hormone-receptor interaction. III. The
endocrine target cell as a quantal response unit;
a general control mechanism.
In: Adv.Exp.Med.Biol. 36, 1973.
90. RODBARD, S.:
Capillary control of blood flow and fluid exchange.
Circulation Research 28, I (1971)
91. RHODER, B.A.:
Effect of exercise on the thyroid gland.
Nature 216, 917 (1967)
92. ROSELL, S., K.BALLARD:
Adrenergic neuro-tumoral control of lipolysis
in adipose tissue.
In: Muscle metabolism during exercise.
Ed. by B.Pernow and B.Saltin, New York-London,
Plenum Press, 1971.
93. ROUSSEAU, G.G., J.D.BAXTER, G.M.TOMKIN:
Glucocorticoid receptors: Relations between steroid
binding and biological effect.
J.Mol.Biol. 67, 99-115 (1972)

94. RUDERMAN, N.B., C.R.S.HOUGHTON, R.HEMS:
Evaluation of the isolated perfused rat hind-
quarter for the study of muscle metabolism.
Biochem.J. 124, 639-651 (1971)
95. SLEIN, M.W.:
Die Glucose-Bestimmung mit Hexokinase und
Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase.
In: H.W.Bergmeyer, Methoden der enzymatischen
Analyse, Weinheim/Bergstraße, Verlag Chemie (1962)
96. SAMUELS, H., G.M.TOMKIN:
Relation of steroid structure to enzyme induction
in hepatoma tissue culture cells.
J.Mol.Biol. 52, 57 (1970)
97. SCHMIDT, F.H.: Die enzymatische Bestimmung von Glucose
und Fructose nebeneinander.
Klin.Wschr. 39, 1244 (1961)
98. SCHWARTZ, H.L., M.J.SUOKS, J.H.OPPENHEIMER:
Quantitation of extrathyroidal conversion of
L-thyroxin to 3-5-3'triiodo-L-thyronine in the rat.
J.Clin.Invest. 50, 1124 (1971)
99. SIEBERT, G.:
Gewinnung und Funktion isolierter Zellkerne.
Zeitschrift Klin.Chem. 4, 93 (1966)
100. SONKSEN, P.H., J.R.McCORMICK, R.H.EGDAHL, J.S.SOELDNER:
Distribution and binding of insulin in the dog
hind limb.
Am.J.Physiol. 221, 1672 (1971)
101. SPENCER-PEET, J., J.R.DALY, V.SMITH:
A simple method for improving the specificity of
fluorimetric determination of adrenal cortico-
steroids in human plasma.
J.Endocrin. 31, 235 (1965)
102. SZABO, A.J., R.J.MAHLER, O.SZABO:
Glucose uptake by the isolated perfused rat hind
limb during rest and exercise.
Horm.Metab.Res. 1, 156-161 (1969)
103. SKINNER, N.S.J., J.C.CORBIC, B.SALTIER, G.VASTAGH:
Glucose uptake in contraction, isolated in situ
dog skeletal muscle.
Adv.Exp.Med.and Biol., Bd. 11 (1971)
104. SURKS, M.J., A.R.SCHADLOW, J.M.STOCK, J.H.OPPENHEIMER:
Determination of iodothyronine absorption and
conversion of L-thyroxine to L-trijodthyronine
using turnover rate technique.
J.Clin.Invest. 52 (1973)

105. TATA, R.J., C.C.WIDNELL:
Rivonucleid acid synthesis during the early
action of thyroid hormones.
Biochem.J. 98, 604 (1966)
106. TERJUNG, R.L., C.M.TRIPTON:
Plasma thyroxine and thyroid stimulating hormone
level during submaximal exercise in human.
Am.J.Physiol. 220, 6 (1971)
107. TOMKINS, G.M.:
The molecular biology of steroid hormones.
In: Adv.Exp.Med. and Biol., Vol 44 (1974)
108. WIDNELL, C.C., J.R.TATA:
Additive effects of thyroid hormone, growth
hormone and testosterone in deoxyribonucleic
acid dependant ribonucle polymerase in rat
liver nuclei.
Biochem.J. 98, 621 (1966)
109. WAHREN, J., L.HAGENFELDT, P.FELIG:
Splanchnic and leg exchange of glucose, amino
acids and free fatty acids during exercise in
diabetes mellitus.
J.clin.Invest. 55, 1303 (1975)
110. WEINGES, K.F., H.WÖRNER:
Über den Einfluß von Insulin und Glucagon auf den
Glucosestoffwechsel des epididymalen Fettanhanges
der Ratte in vitro.
Klin.Wschr. 39, 238 (1961)
111. WILSON, O.:
Field study of the effect of cold exposure and
increased muscular activity upon metabolic rate and
thyroid function in man.
Fe.Proc. 25, 1357 (1968)

Lebenslauf

Roland Gärtner geboren am 27.4.1947 in Friedberg/Bayern,
als Sohn des Tierarztes Dr. Eugen Gärtner
und seiner Frau Sieghilde, geborene Bernhardt.

Schulbildung Volksschule Friedberg von 1953 bis 1958,
Holbein-Oberrealschule Augsburg von 1958 bis
1966, dann Priv. Höhere Lehranstalt Dr.Schönhärl
und Wild von 1966 bis 1968.
Abschluß: Reifeprüfung am Max Planck-Gymnasium
in München-Pasing am 23. Juli 1968.

Ersatzdienst Vom 1.10.1968 bis 24.11.1968 Bundeswehr, dann
Anerkennung als Wehrdienstverweigerer.
Ersatzdienst vom 1.4.1969 bis 31.7.1970 beim
BRK München.

Studium Seit Wintersemester 1970/71 Studium der
Humanmedizin an der Ludwig Maximilian-
Universität München. Im Sommersemester 1971
Vorphysikum, im Wintersemester 1972/73
ärztliche Vorprüfung.
Seit 1974 Arbeit an dieser Dissertation.
Am 23.6.1976 medizinisches Staatsexamen,
am 21.7.1976 amerikanisches Staatsexamen
in Medizin.

Bisherige Tätigkeit Seit 1.8.1976 arbeite ich als Medizinalassistent
an der Medizinischen Universitätsklinik
Innenstadt München.

